

**DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE MEDICIÓN IN-VITRO
QUE PERMITA SENSAR EL TRÁNSITO DE SODIO EN EPITELIO DE PIEL
UTILIZANDO LA TÉCNICA DE BIOIMPEDANCIA**

BRIAN STEVENS VALENCIA CAMACHO

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE
FACULTAD DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE AUTOMÁTICA Y ELECTRÓNICA
PROGRAMA INGENIERÍA BIOMÉDICA
SANTIAGO DE CALI
2017**

**DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE MEDICIÓN IN-VITRO
QUE PERMITA SENSAR EL TRÁNSITO DE SODIO EN EPITELIO DE PIEL
UTILIZANDO LA TÉCNICA DE BIOIMPEDANCIA**

BRIAN STEVENS VALENCIA CAMACHO

Proyecto de grado para optar al título de ingeniero biomédico

**Director
FARUK FONTHAL RICO
Doctor en ingeniero electrónico**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE
FACULTAD DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE AUTOMÁTICA Y ELECTRÓNICA
PROGRAMA INGENIERÍA BIOMÉDICA
SANTIAGO DE CALI
2017**

NOTA DE ACEPTACIÓN:

Aprobado por el Comité de Grado en cumplimiento de los requisitos exigidos por la Universidad Autónoma de Occidente para optar al título de INGENIERO BIOMÉDICO

**ANDRES MAURICIO GONZALES
VARGAS**

Jurado

WILFREDO AGREDO RODRIGUEZ

Jurado

Santiago de Cali, 8 de marzo de 2017

CONTENIDO

	Pág.
1 INTRODUCCIÓN	15
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
1.2 JUSTIFICACIÓN	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GENERAL	19
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	19
3 ANTECEDENTES	20
3.1 ANTECEDENTES DE LA MEDIDA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICA	20
3.2 ANTECEDENTES DEL VOLTAGE CLAMP	23
4 MARCO TEÓRICO	24
4.1 DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA DEL TEJIDO EPITELIAL	24
4.1.1 Tejido Epitelial	24
4.1.1.1 Morfología del epitelio estratificado plano (pavimentoso)	26
4.1.1.2 Especie <i>Eleutherodactylus Johnstonei</i> (Antillas coqui)	27
4.2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA BIOIMPEDANCIA	28
4.2.1 Propiedades eléctricas de los tejidos biológicos	28
4.2.2 Dispersión en los tejidos biológicos.	29
4.2.3 Medición de conductividad y permitividad en los tejidos.	31
4.2.4 Modelamiento matemático y circuital del tejido	32
4.2.4.1 Descripción matemática de la relajación dieléctrica.	33

4.2.5 Impedancia de Electrodo.	37
4.2.5.1 Potenciales característicos en los electrodos	38
4.2.6 Circuitos para medir bioimpedancia	38
4.2.6.1 El puente de impedancia	38
4.2.6.2 Resonancia	39
4.2.6.3 Puente activo equilibrado	39
4.2.6.4 Método a dos electrodos (2EM)	40
4.2.6.5 Método de 4 electrodos o tetrapolar (4EM)	41
4.2.6.6 Método de tres electrodos (3EM)	42
4.3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA TÉCNICA VOLTAGE CLAMP	43
4.3.1 Membrana plasmática, estructura y función de las proteínas de membrana.	43
4.3.2 Estructura de la membrana	43
4.3.3 Movimiento de sustancias a través de membranas celulares.	44
4.3.3.1 Transporte Pasivo	45
4.3.3.2 Transporte activo	47
4.3.4 Cámara Ussing	48
4.3.5 Voltage Clamp.	48
4.3.6 Voltage Clamp de dos electrodos.	50
4.3.7 Comportamiento eléctrico	51
4.3.8 Nuevos desarrollos e implementaciones del Voltage Clamp.	53
4.3.9 Evolución del Voltage Clamp.	54
4.3.10 Voltage Clamp de un solo electrodo	54
4.3.11 Nuevas Propuestas	56
4.3.11.1 Abrazadera discontinua de voltaje de un solo electrodo	56

5	METODOLOGÍA DE DISEÑO	57
5.1	DECLARACIÓN DE LA MISIÓN	58
5.2	IDENTIFICACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LAS NECESIDADES	58
5.3	ESPECIFICACIONES TÉCNICAS	59
5.4	RELACIÓN ENTRE MÉTRICAS Y NECESIDADES	60
5.5	GENERACIÓN DE CONCEPTOS	61
5.5.1	Descomposición funcional:	61
5.5.2	Tecnología	64
5.5.2.1	Microcontrolador	64
5.5.2.2	Conversión de tensión a corriente y amplificación	65
5.5.3	Configuraciones para el conversor de tensión a corriente y amplificación.	68
5.6	CONCEPTOS DE DISEÑO	70
5.7	SELECCIÓN DE CONCEPTOS	71
5.7.1	Matriz para el tamizaje de conceptos.	71
5.7.2	Matriz para evaluar conceptos.	72
5.8	ARQUITECTURA	72
5.8.1	Diagrama esquemático.	72
5.9	PROTOTIPADO	75
6	DISEÑO DEL SISTEMA DE MEDICION	77
6.1	GENERADOR DE ONDA SINUSOIDAL CON FRECUENCIA VARIABLE Y AJUSTE DE OFFSET (FRECUENCIA DE TRABAJO 1 KHZ A 100 KHZ).	77
6.1.1	Generación de la onda.	77
6.1.2	Ajuste de offset.	78
6.2	CÁMARA USSING ADAPTADA AL MÉTODO DE TRES ELECTRODOS.	79

6.2.1 Phantom patron.	79
6.2.2 Cámara Ussing adaptada al método de tres electrodos.	79
6.2.3 Electrodo de medida	80
6.3 SISTEMA DE CLAMP	81
6.3.1 Amplificador sumador.	82
6.3.2 Configuración de amplificador diferencial	82
6.3.3 Etapa de Instrumentación.	83
6.3.4 Conversión de tensión a su equivalente en corriente de sodio	83
6.4 CONVERTIDOR DE TENSIÓN A CORRIENTE – AMPLIFICACIÓN	84
6.5 SENSORES DE TENSIÓN Y DE CORRIENTE	85
6.6 INTERFAZ GRÁFICO:	85
6.6.1 Matlab herramienta matemática.	85
6.7 CÁLCULO DE PARÁMETROS ELÉCTRICOS	86
6.7.1 Cálculo de la parte real (Re) e Imaginaria (Im) de la impedancia	87
6.7.2 Cálculo de la Conductancia (Gm) y Capacitancia (Cm).	87
6.8 ANÁLISIS MATEMÁTICO PARA DISEÑO DEL PHANTOM	88
7 DISCUSIÓN Y RESULTADOS OBTENIDOS	90
7.1 FASE 1 CALIBRACIÓN DEL SISTEMA	90
7.1.1 Adquisición de datos mediante Arduino y Matlab.	90
7.2 FASE 2 MEDICIÓN A TEJIDO EPITELIAL	92
7.2.1 Toma de datos:	93
7.2.2 Análisis Matemático	97
7.2.3 Diseño del Phantom	98
7.3 FASE 3: VALIDACIÓN	100
8 CONCLUSIONES	102

BIBLIOGRAFIA

104

ANEXOS

112

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Clasificación de los diferentes tipos de epitelios de revestimiento	26
Figura 2. Esquema de la organización del epitelio estratificado plano queratinizado	27
Figura 3. Estructura de la membrana celular	28
Figura 4. Conductividad y permitividad en función de la frecuencia	30
Figura 5. Modelo que representa los principales mecanismos que determinan la impedancia de una suspensión celular	33
Figura 6. Representación de la ecuación de Debye (a) Diagrama de Bode y Nyquist para dieléctrico perfecto (b) considerando la pérdidas por corriente de conducción	35
Figura 7. Circuito equivalente para la ecuación de Debye (b) modelo con conductividad estática considerada	35
Figura 8. Circuito eléctrico modelado con la ecuación para permitividad (b) impedancia	37
Figura 9. Circuito equivalente de electrodo para biopotencial.	38
Figura 10. Método auto-equilibrado	40
Figura 11. Configuración Método a dos electrodos (2EM)	41
Figura 12. Configuración Método de 4 electrodos o tetrapolar (4EM)	42
Figura 13. Configuración del método a 3 electrodos (3EM)	42
Figura 14. Membrana celular	43
Figura 15. Cámara Ussing	48
Figura 16. (a) Voltage Clamp ideal (b) Voltage clamp real	49
Figura 17. Circuito de fijación de tensión de dos electrodos. El circuito puede ser conmutado o bien a fijación de voltaje (VC) o la corriente (IC).	51

Figura 18.Respuesta iónica de la célula frente a una despolarización de 10 mV	52
Figura 19. Esquema del comportamiento de membrana frente a un pulso fijo de corriente.	53
Figura 20.Nuevos métodos de Voltage Clamp	54
Figura 21. Voltage Clamp de un solo electrodo	55
Figura 22.Esquema de la metodología de diseño aplicada	57
Figura 23. Diagrama funcional del sistema de medición.	63
Figura 24.Características técnicas del Arduino Uno	64
Figura 25.Características técnicas del Arduino Due.	65
Figura 26.Características técnicas del Arduino Due.	65
Figura 27.Conversión de tensión a corriente convencional – Amplificador AD8016	69
Figura 28.AD629 –AD8016	69
Figura 29.Conversor de tensión a corriente convencional sin amplificación	70
Figura 30.AD629 sin amplificación	70
Figura 31.Diagrama esquemático	74
Figura 32.Tipo de prototipo	75
Figura 33.Onda generada por el Arduino	78
Figura 34.Malla de compensación para amplificador no inversor	78
Figura 35.Phantom con su respectivo comportamiento de Amplitud y fase.	79
Figura 36.Cámara Ussing	80
Figura 37.configuración de pre procesamiento de la señal	82
Figura 38.Configuración diferencial	82
Figura 39.configuración de la etapa de instrumentación	83

Figura 40. Configuración de conversión de tensión a corriente	84
Figura 41. Convertidor de tensión a corriente – amplificación	84
Figura 42. Entorno de trabajo de Matlab	85
Figura 43. diagrama de bode de algunos ajustes	86
Figura 44. . Representación esquemática de las propiedades de combinación simple circuito ideales	88
Figura 45. Sistema de medición en funcionamiento	89
Figura 46. Tensión y corriente media del phantom, obtenidas de la adquisición de datos.	91
Figura 47. Ecuación de transferencia del phantom y sus diferentes parámetros	91
Figura 48. Ensayos realizados al Phantom patrón	92
Figura 49. Diagrama de bode de la impedancia del tejido número 1	93
Figura 50. Diagrama de bode de la impedancia del tejido número 2	95
Figura 51. Impedancia Tejido 1	97
Figura 52. Impedancia compleja Tejido 2	97
Figura 53. Representación de la impedancia compleja y la dependencia de la combinación serie paralelo de la capacitancia y la conductancia de la frecuencia.	98
Figura 54. Phantom tejido 1	99
Figura 55. Phantom tejido 2	99
Figura 56. Diagrama de bode de la impedancia del phantom	100

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Declaración de la misión	58
Tabla 2. Identificación e interpretación de las necesidades	59
Tabla 3. Especificaciones técnicas	60
Tabla 4. Relación entre especificaciones técnicas y necesidades	61
Tabla 5. Ventajas, características y aplicaciones del LF356	66
Tabla 6. Ventajas, características y aplicaciones del AD629	67
Tabla 7. Ventajas y características del AD8016	68
Tabla 8. Conceptos de diseño	71
Tabla 9. Matriz de tamizaje	71
Tabla 10. Matriz para evaluar conceptos	72
Tabla 11. Parámetros eléctricos obtenidos de las mediciones realizadas al primer tejido	94
Tabla 12. Parámetros eléctricos obtenidos de las mediciones realizadas al segundo tejido	96
Tabla 13. Tabla de comparación entre componentes	99
Tabla 14. Parámetros eléctricos obtenidos de las mediciones del phantom 2	101

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A.Código correspondiente al generador de onda sinusoidal con frecuencia variable y ajuste de offset (frecuencia de trabajo 1 khz a 100 khz)	112
Anexo B.Sensores de tensión, de corriente y de corriente de sodio: en el siguiente apartado se mostrara tanto el código empleado en Arduino como el empleado en matlab para la adquisición de datos	114

RESUMEN

En el presente trabajo se describirá el diseño e implementación de un sistema de medición in-vitro, basado en la técnica de Voltage Clamp, el cual permitirá sensar la bioimpedancia y el tránsito de la corriente de sodio mediante la medición de tensión inducida, al inyectar en un tejido y/o phantom una corriente alterna de frecuencia variable entre 1 kHz – 100 kHz. La medición de tensión inducida tendrá una etapa de acondicionamiento la cual permitirá una correcta caracterización eléctrica, para esto se desarrollaron diferentes secciones funcionales: Generador de onda sinusoidal con frecuencia variable y ajuste de offset (frecuencia de trabajo 1 kHz a 100 kHz), Tejido – Phantom y sistema de inyección de soluciones, sistema de clamp, sensores de tensión y corriente. Después de obtener los datos de tensión y corriente se procede a enviarlos por puerto serial al PC en donde son analizados en Matlab, para así poder calcular las ecuaciones que describen, el comportamiento eléctrico del tejido y/o phantom y con esta obtener los demás parámetros tales como capacitancia, conductancia e impedancia, con el fin de realizar la caracterización eléctrica completa y poder plantear un modelo eléctrico equivalente al tejido estudiado.

Para el diseño de este sistema se tuvieron en cuenta ciertas consideraciones, ya que las frecuencias de trabajo son altas (100 kHz), se necesitó seleccionar tanto componentes electrónicos, microcontroladores, filtros, electrodos y soporte, los cuales permitirán hacer las mediciones correctas sin apantallamientos ni ruidos que alterarán los datos que se necesitaban.

La mediciones se tomaron en tres etapas diferentes, en la primera se realizaron mediciones a un phantom patrón del cual se conoce su comportamiento eléctrico (magnitud y fase de la impedancia) esto con el fin de ajustar los parámetros a medir a los rangos requeridos, en la segunda se detectaron variables electrofisiológicas en tejido epitelial del anfibio “*eleutherodactylus johnstonei*”(Antillas coqui), con los datos obtenidos se analizaron los comportamientos eléctricos correspondientes para la caracterización eléctrica del tejido, en la última etapa se diseñó un phantom a partir de los datos obtenidos en la segunda etapa, este phantom se someterá a las mismas mediciones que los tejidos, con el fin de comprobar que el modelo desarrollado efectivamente describe el comportamiento eléctrico del tejido.

Palabras claves: Bioimpedancia, Voltage Clamp, phantom, conductancia, permitividad.

1 INTRODUCCIÓN

En este proyecto se abordaran dos técnicas: por un lado la técnica de la bioimpedancia, que es un enfoque utilizado en las mediciones de la composición corporal y en los sistemas de evaluación de la salud. Los fundamentos esenciales de la medición de bioimpedancia en el cuerpo humano se utilizan para interpretar la información electrofisiológica en los tejidos; por otro lado la técnica de Voltage Clamp, la cual se utiliza con frecuencia para examinar la fuerza y la composición de la entrada sináptica de las neuronas teniendo en cuenta el control de tensión de toda la membrana celular, en donde se asume que las corrientes medidas en el soma son un indicador proporcional de la conductancia postsináptica¹.

Muchas patologías que afectan la población que ocasionan graves repercusiones a nivel social, económico y de salud, se basan en cambios estructurales, bioquímicos y funcionales que subyacen a la enfermedad en células y tejidos, estas patologías se ven reflejadas en parámetros electrofisiológicos, que al detectarse en una etapa temprana podrían hacer la diferencia entre un mejor estilo de vida e, incluso, entre la vida y la muerte.

Actualmente se emplean algunas técnicas con tecnologías que no brindan la suficiente precisión y/o exactitud a la hora de dar un diagnóstico, o son demasiado costosas a nivel tecnológico, de desarrollo e implementación. A partir de ello, y teniendo en cuenta que las técnicas de bioimpedancia y Voltage Clamp son técnicas que tienen un amplio espectro de utilización para el pronóstico de anomalías estructurales y electrofisiológicas en el campo de la salud, y que ambas tienen gran afinidad y similitud en la medición de parámetros eléctricos corporales (tales como impedancia, tensión, corriente, permitividad y conductividad), se planteó la unión de ambos métodos con el fin de investigar los beneficios que implicaría. Para esto se plantearon los siguientes interrogantes: ¿Se pueden replicar los resultados que se realizan de manera individual con cada técnica? y ¿cuáles serían los pros que traería el uso de ambas en la detección de cambios tanto anatómicos como fisiológicos mediante la medición de las propiedades dieléctricas de los tejidos biológicos?

A partir de esto se diseñó un dispositivo para permitir de manera conjunta la medición de las variaciones de tensión y corriente, impedancia y conductividad mediante la inyección de corriente alterna con un rango de frecuencia de 1 kHz

¹ ALON POLEG, Polsky. DIAMOND, Jeffrey S. Imperfect Space Clamp Permits Electrotonic Interactions between Inhibitory and Excitatory Synaptic Conductances, Distorting Voltage Clamp Recordings[en línea].Base de datos PMC, 2011 Abril 29 [consultado 20 enero de 2016]. Disponible en internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3085473/>

a 100 kHz aplicada a tejido epitelial del anfibio *Eleutherodactylus Johnstonei* (Antillas coqui), el cual será estimulado para poder controlar la apertura de los canales de sodio. Las magnitudes obtenidas en las pruebas se utilizarán para la caracterización eléctrica y subsecuente creación de un phantom que simule el comportamiento eléctrico del tejido.

En el presente documento se encuentra una descripción detallada de todo el proceso de desarrollo del prototipo, al igual que el apoyo teórico, la metodología de desarrollo, el desarrollo del sistema de medición junto con la descripción de cada una de las partes que lo conforman y su funcionalidad, las mediciones que se realizaron, la documentación de los resultados y el análisis de éstas.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Muchas patologías en los humanos relacionadas con la enfermedad en las células y tejidos, tienen relación con cambios estructurales, anatómicos y/o bioquímicos. Algunos de los ejemplos más claros son los tumores o enfermedades degenerativas, estas patologías pueden verse reflejados en cambios eléctricos en el cuerpo; en el caso de un crecimiento celular correspondiente a un tumor², en especial maligno, significa que para la persona que lo padezca existe una alta probabilidad de que su vida está en peligro de no ser detectada oportunamente. Según un informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en 2012 hubo unos 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer³; por otro lado las lesiones o atrofiamientos celulares son unas de las características de muchas enfermedades degenerativas de las cuales existen una gran variedad tales como las enfermedades de la neurona motora que son un grupo de trastornos neurológicos progresivos que destruye las neuronas motoras, las células que controlan la actividad muscular voluntaria esencial como hablar, caminar, respirar y tragar⁴, en un informe de la (OMS) cientos de millones de personas en todo el mundo sufren trastornos neurológicos. Aproximadamente 6,2 millones de personas mueren cada año por accidentes cerebrovasculares

² Tumor [en línea]. Medline [consultado octubre 20 2016] disponible en internet: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/001310.htm>

³ Datos y cifras sobre el cáncer. [en línea]. Organización Mundial de la Salud, Febrero de 2017 [consultado 20 Enero del 2016]. Disponible en internet: <http://www.who.int/cancer/about/facts/es/>

⁴ Enfermedades de la neurona motora. [en línea]. Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Accidentes Cerebrovasculares, Diciembre 20 del 2016. [Consultado en Noviembre 4 del 2016] Disponible en internet: https://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/enfermedades_de_la_neurona_motora.htm

un trastorno neurológico, más del 80% de estas muertes se producen en países de ingresos bajos o medianos⁵.

Como es evidente el impacto a nivel social, económico y de salud es bastante significativo y tan solo se nombraron dos patologías de una amplia gama existente que se relacionan con anomalías celulares, teniendo en cuenta que estas patologías tiene un factor común, los cambios electrofisiológicos, que algunas pruebas además de ser invasivas no detectan estos pequeños cambios eléctricos y que las tecnologías que si lo detectan tiene un alto costo de desarrollo, implementación y mantenimiento. Todos estos aspectos motivaron el desarrollo de este proyecto. A partir de la siguiente pregunta problema.

¿Sería posible diseñar e implementar un sistema de medición in-vitro que permita sensar el tránsito de sodio mediante la impedancia combinado las técnicas de bioimpedancia y Voltage Clamp?

1.2 JUSTIFICACIÓN

El propósito de este proyecto es desarrollar un sistema de medición basado en las técnicas de bioimpedancia y Voltage Clamp que detecte los cambios electrofisiológicos, brindando así una herramienta confiable para el estudio de anomalías celulares.

Como se mencionó anteriormente, las patologías relacionadas con cambios estructurales, anatómicos y celulares tienen un amplio impacto, a nivel social por la alta tasa de mortalidad y morbilidad que representan estas enfermedades. A nivel económico, estas patologías tienen una alta repercusión tanto para el individuo como para la comunidad, ya que su tratamiento, medicamentos y demás aspectos tiene un costo muy elevado. Por otro lado, a nivel de salud, las estadísticas demuestra que las enfermedades relacionadas con anomalías celulares tales como el cáncer o trastornos neurológicos por nombrar algunas, corresponden a unas de las enfermedades que mayor impactan la sociedad a nivel mundial.

Por ende, tener un dispositivo que permita detectar los cambios eléctricos en las células representaría un gran avance y una gran ayuda para que

⁵ Los trastornos neurológicos afectan a millones de personas en todo el mundo [en línea] Organización Mundial de la Salud, Enero 06 del 2017 [consultado Noviembre 4 del 2016]. Disponible en internet: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2007/pr04/es/>

investigadores en un futuro puedan crear un dispositivo que detecte en etapas tempranas estas patologías de forma exacta y precisa.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Diseñar e implementar un sistema de medición in-vitro que permita registrar la corriente de sodio en epitelios utilizando la técnica de bioimpedancia.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Realizar una revisión de las técnicas de instrumentación utilizados para el registro de corrientes de Sodio.

Adaptar un sistema de adquisición, medida y procesado que interprete las variaciones de impedancia a diferentes frecuencias hasta 100 kHz.

Realizar las caracterizaciones del comportamiento eléctrico de los tejidos epiteliales.

Obtener un modelo eléctrico ideal que permita estimar el comportamiento de los epitelios ante la inyección de corrientes.

Validar por medio de software específico de simulación para mediciones eléctricas los modelos obtenidos.

3 ANTECEDENTES

A continuación se nombran los antecedentes para la medida de bioimpedancia y para el Voltage Clamp de forma individual para mejor comprensión.

3.1 ANTECEDENTES DE LA MEDIDA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICA

Durante los siglos XIX, XX y XXI, en diferentes áreas médicas y biológicas se han venido estudiando las propiedades eléctricas de los tejidos biológicos mediante la técnica de bioimpedancia por permitir la caracterización de los tejidos y sistemas biológicos de forma no invasiva. Uno de los primeros trabajos realizados data de la década de 1890, cuando G.N. Stewart usó la conductividad eléctrica de la sangre para caracterizar los tiempos de circulación de ésta por los diferentes órganos⁶. Sin embargo no fue hasta 1941 cuando Cole y Cole propusieran una ecuación empírica que describe el comportamiento eléctrico de una suspensión de esferas conductoras en un medio resistivo⁷, desarrollando modelos matemáticos, circuitos equivalentes y descripciones para los vectores de impedancia. Esta ecuación también puede ser escrita en función de la impedancia compleja que matemáticamente describe el comportamiento de frecuencia de Fricke y el circuito eléctrico simple de Morse con el condensador reemplazado por uno de Ángulo Fase Constante, o elemento de CPA. Con este pseudo-capacitor es fácilmente realizable el paso de los parámetros del modelo matemático de Cole al modelo circuital⁸. Tal es la importancia de estos trabajos que hoy en día continúan utilizando sus modelos en la caracterización de las medidas espectrales de impedancia.

Otros aportes de gran importancia se dieron en la década de 1950 con los trabajos de Herman que estudió extensamente las propiedades eléctricas de los tejidos biológicos de diferentes tipos, desarrollando técnicas para realizar mediciones en diferentes rangos de frecuencia⁹, o de Nyober(1974) y Kubicek (1966) pioneros en la aplicación del concepto de impedancia a la fisiología

⁶ ROBLES MORA, Leonor A. CHAVEZ CIFUENTES, Jair F. Medición de impedancia eléctrica en tejido cervical uterino in-vitro. Trabajo de grado ingeniero electrónico. Bucaramanga, Universidad Industrial de Santander. Facultad de ingenierías físico-mecánicas. Escuela de ingenierías eléctrica, electrónica y telecomunicaciones. junio de 2005. p.20.

⁷ Ibid. p. 23.

⁸ WALKER, Dawn Carol. Modelling the Electrical Properties of Cervical Epithelium. Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy. U.K. University of Sheffield. Department of Medical Physics and Clinical Engineering. October 2001. p. 16.

⁹ BOURNE John R. Bioelectrical Impedance Techniques in Medicine. En: Critical Reviews in Biomedical Engineering. New York. 1996, vol, 24, no, 4-6. p.240.

cardiovascular ¹⁰. Estas aplicaciones se han visto complementadas por otros estudios, como son los de crecimientos celulares, composición corporal, movimiento de fluidos y distinción entre tejidos sanos y cancerosos, que han constituido el núcleo de trabajo para las medidas de bioimpedancia, ya sean a una frecuencia o mediante el estudio de su espectro.

En 1978, Henderson y Webster presentan la idea de la utilización de estas medidas para la obtención, de imágenes del interior del objeto, nace así la primera técnica de imágenes de impedancia eléctrica¹¹. Que es una técnica de imagen médica en la cual se infiere una imagen de la conductividad o permitividad de alguna parte del cuerpo a partir de mediciones eléctricas de superficie, en los años 80, la universidad inglesa de Sheffield (Brown y Barber, 1982) desarrollaron lo que hoy en día se entiende por tomografía de impedancia eléctrica (TIE). Con esta técnica se pretende representar imágenes de la distribución de conductividad en el interior de la sección en cuyo contorno se han obtenido las medidas de tensión.

Las aplicaciones médicas que actualmente utilizan los sistemas de espectroscopia y tomografía de impedancia eléctrica son muy diversas, encontrándose, por ejemplo, medidas en tejidos oculares de Jürgens en 1996, pulmonares por Hahn en 1995 o tumores por Blad y Baldetorp en 1996. También ha sido empujada con éxito para monitorizar procesos isquémicos, detectar rechazos post-trasplante o para localizar tumores cancerosos¹².

Otras publicaciones acerca de la aplicación de la Espectroscopia de la Impedancia Eléctrica (EIE), en donde se estudió el comportamiento del factor dieléctrico en tejidos patológicos y en tejidos normales, para esto el grupo de investigación perteneciente al Centro de Ingeniería Biomédica de Venezuela, tomaron 16 muestras de tejido mamario en acto quirúrgico de dieciséis intervenciones divididas de la siguiente manera: 8 cadáveres femeninos presumibles sin lesión, 4 intervenciones de mastectomía, 4 intervenciones de biopsias exploratorias. Los resultados obtenidos mostraron que el factor de pérdida dieléctrica de las muestras sanas es diferenciable del factor de disipación dieléctrica de las muestras patológicas. Esta diferencia es notable

¹⁰ CASAS, O. Contribución a la Obtención de Imágenes Paramétricas en Tomografía de Impedancia Eléctrica para la Caracterización de tejidos Biológicos. Tesis Doctoral. Barcelona Universidad Politécnica de Cataluña, Septiembre de 1998, p.20.

¹¹ ALEMAN, Iguran, Belis Paola. PAEZ DURAN, Blanca Isabel. Modelado y simulación de propiedades eléctricas de tejido epitelial estratificado sano. Trabajo de grado para optar al título de Ingenieras Electrónicas. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ingenierías físico- mecánicas, Escuelas de ingeniería Eléctrica, Electrónica y Telecomunicaciones, 2006. p.18.

¹² ALON, Op. cit. p .2.

desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo, lo que pudiera indicar la posibilidad de diferenciar el tipo de patología presente en el tejido¹³.

Gracias a los estudios en propiedades eléctricas se han logrado desarrollar diferentes métodos de medición de bioimpedancia, estudios como el de medición no invasiva por medio de electrodos de Salazar, la de corrientes inducidas por campos magnéticos de Hagmann; y el estudio de Gandhi y Chen, y Blackwell que aportaron los métodos híbridos que combinan las dos técnicas. Estos métodos proporcionan información sobre las características eléctricas de bioimpedancia y sus cambios ante patologías, sin invadir los tejidos¹⁴. De igual forma, la gran variedad de tejidos y sus particulares propiedades eléctricas y dieléctricas hacen de la bioimpedancia una técnica para el monitoreo de imagen del cuerpo y sus partes.

Una evidencia del esfuerzo e interés en esta área se representa en la existencia de un Comité Internacional para la Promoción de la Investigación en Bioimpedancia (ICPRBI), el cual ha impulsado la realización de once Conferencias Internacionales sobre Bioimpedancia Eléctrica entre 1969 (New York) y 2001 (Oslo). La mayoría de las investigaciones y publicaciones han sido dirigidas principalmente al desarrollo de protocolos de medida adecuados, el uso de electrodos de contacto, mejorar la instrumentación y a la mejor interpretación de los resultados. En Colombia se han desarrollado algunos trabajos de medición de bioimpedancia en muestras animales como los realizados por González, en 1997y por Moncada en el 2008 y en pacientes por González en 2007.

El método de medición de propiedades eléctricas con bioimpedancia es de bajo costo, de medición rápida y presenta aplicación para muchas partes del cuerpo. La baja exactitud reportada (al compararlo con el gold estándar) ha reducido la credibilidad del método. Sin embargo, recientes investigaciones han mostrado por ejemplo, que el método de espectroscopia de bioimpedancia puede ser tan precisa como los métodos de diluciones tradicionales, y aún mejor¹⁵.

¹³ FARIÑAS, Wilfredo. Paz, Zenaida. Orta, Gregorio. Denis, Ernesto. Estudio del factor de perdida dieléctrica de tejidos mamarios en condiciones patológicas y tejido mamario en condiciones normales. La habana Cuba. En: Memorias II Congreso Latinoamericano De Ingeniería Biomédica, Habana Cuba 2001, Mayo 23 -25, 2001. p.3.

¹⁴ MONCADA, María E., *et al.* Medición de impedancia eléctrica en tejido biológico. En: Revista Tecno Lógicas. Diciembre, 2010, no, 25, p.4.

¹⁵ MEDRANO, G. Modeling the Influence of Body Position in Bioimpedance Measurements. Proceedings of the 29th Annual International Conference of the IEEE EMBS. Agosto 22-26, 2007.p.6.

3.2 ANTECEDENTES DEL VOLTAGE CLAMP

En la década de 1930, el axón del calamar se convirtió en el objeto experimental favorito para explorar las bases del potencial de acción. En 1947, George Marmont inventó una cámara para estudiar dicho axón¹⁶ este soporte posteriormente fue empleado en los primeros estudios de Voltage Clamp que se remontan a Cole en 1949 y Hodgkin a en el 1952¹⁷ estos estudios fueron fundamentales para esclarecer el mecanismo de generación de potencial de acción, en estas implementaciones el Voltage Clamp se aplicó al axón del calamar gigante usando electrodos de alambre. Donde se utilizaba un amplificador de sujeción que en esencia era un amplificador operacional que emitía una corriente proporcional al desajuste del potencial de membrana medido y la tensión de mando.

Estas ideas se desarrollaron a partir de una consideración de la técnica de sucrose-gap introducida por Stampfli (1954) para el estudio del potencial de membrana de pequeños haces de fibras de rana¹⁸, la cual se utiliza para crear un bloqueo de conducción en fibras nerviosas o musculares. Se aplica una alta concentración de sacarosa al espacio extracelular para aumentar la resistencia entre dos grupos de células, lo que impide la apertura y el cierre correctos de los canales de sodio y potasio.

El avance de la electrónica aportó nuevas tecnologías en integrados como los amplificadores de propósito específico los cuales fueron diseñados para eliminar las corrientes longitudinales (axiales) permitiendo que el potencial de acción se produjera solamente en un *locus*, así surgió el Patch Clamp el cual permitió que las corrientes de membrana fueran medidas en función del tiempo en cualquier tensión dada¹⁹, esta nueva técnica fue utilizada por primera vez por Neher y Sakmann en 1976 y que les merecería el premio Nobel en el año 1992.

¹⁶ MOORE, John W. Voltage Clamp [en línea] Scholarpedia, 2007. [consultado Junio 28 del 2016] Disponible en internet : http://www.scholarpedia.org/article/Voltage_clamp

¹⁷ DIETER, Jaeger. Ranu, Jung. Encyclopedia of Computational Neuroscience. New York: Springer Science, 2015. p.1039.

¹⁸ FRED, Julian. Moore, John. GOLDMAN David E. Current-Voltage Relations in the Lobster Giant Axon Membrane Under Voltage Clamp Conditions. En: The journal of general physiology. 1962, vol, 45. p.3.

¹⁹ DIETER, Op. cit., p.1049

4 MARCO TEÓRICO

En primera instancia se hablara de la Histología del tejido que se estudiara y posteriormente dado que este proyecto se basa en dos técnicas, se describirán los aspectos relacionados con ambas: Bioimpedancia y con el Voltage Clamp.

4.1 DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA DEL TEJIDO EPITELIAL

En la anatomía, zoología y biología se entiende por tejido, la agrupación de células semejantes que generalmente poseen un origen embrionario común que conforman la estructura de un dado órgano para desarrollar ciertas actividades especializadas.

Existente tanto tipos de tejidos animales como vegetales en este apartado se describirán los tejidos animales ya que son los que se emplearan para el estudio.

Los tejidos animales se clasifican en:

- Tejido muscular
- Tejido nervioso
- Tejido epitelial
- Tejido conectivo
- El tejido bajo estudio en este proyecto es el tejido epitelial por tal razón solo se describirán las características de este tipo de tejido.

4.1.1 Tejido Epitelial. El tejido epitelial es la variedad de tejido básico o primario constituido por agrupaciones de células situadas en forma adyacente, fuertemente adheridas entre sí, unidas unas con las otras formando serie de láminas caracterizadas por tener una escasa matriz extracelular, relacionada con el tejido conjuntivo a través de la membrana basal. Carecen de vasos sanguíneos, linfáticos y de fibras nerviosas, siendo su origen embriológico a partir de cualquiera de las tres hojas embrionarias. Las poblaciones celulares epiteliales, presentan una renovación constante debido a lo cual encontramos en ellos células indiferenciadas que pueden actuar como células madres y

células diferenciadas, especializadas en las funciones que le son propias, este tipo de tejido es el único que proviene de las capas blastodérmicas²⁰.

Cualquier tipo de célula epitelial presenta dos propiedades que lo caracterizan la cohesión y la polaridad. La cohesión, está dada por la tendencia que tienen a estar fuertemente adheridos entre sí, lográndose ello por las especializaciones de las superficies celulares. La polaridad tiene que ver con los constituyentes de su citoesqueleto, mismos que les permiten conservar su forma, relacionarse con estructuras vecinas y mantener los organelos en posiciones específicas (polaridad celular). Son tres tipos de filamentos los que interactúan entre ellos para formar el citoesqueleto epitelial: microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermedios, se manifiesta por la presencia de una superficie basal, adjunta al tejido conjuntivo y una superficie apical libre que da a la superficie o a la luz de un órgano, destacándose la disposición particular y estable de los organelos citoplasmáticos y de las especializaciones de la superficie celular.

La clasificación morfológica de los epitelios se basa en los siguientes criterios: El primero se refiere al número de capas que incluye: si presenta una sola capa de células el epitelio es simple, y si posee dos o más capas se clasifican, como estratificados. Cuando el epitelio tiene una sola capa de células, pero da la impresión de poseer más de una, se considera pseudoestratificado. Otro criterio es la forma que presentan las células, siendo clasificadas como, planas, cúbicas y cilíndricas.

Por la disposición, estructura y función de las células epiteliales, este tejido se divide en dos grandes grupos. El primero lo constituyen los epitelios o membranas epiteliales de cubierta y revestimiento, que son capas de células especializadas en funciones de protección, absorción e intercambio y el segundo los epitelios glandulares, que son masas o agrupaciones celulares, especializados en la secreción. Su clasificación más general se expresa en el cuadro siguiente.

²⁰ Tejidos animales epitelios de revestimiento [en línea] Atlas de histología vegetal y animal [consultado 01 Diciembre del 2016]. Disponible en internet: https://mmegias.webs.uvigo.es/guiada_a_revestimiento.php

Figura 1. Clasificación de los diferentes tipos de epitelios de revestimiento

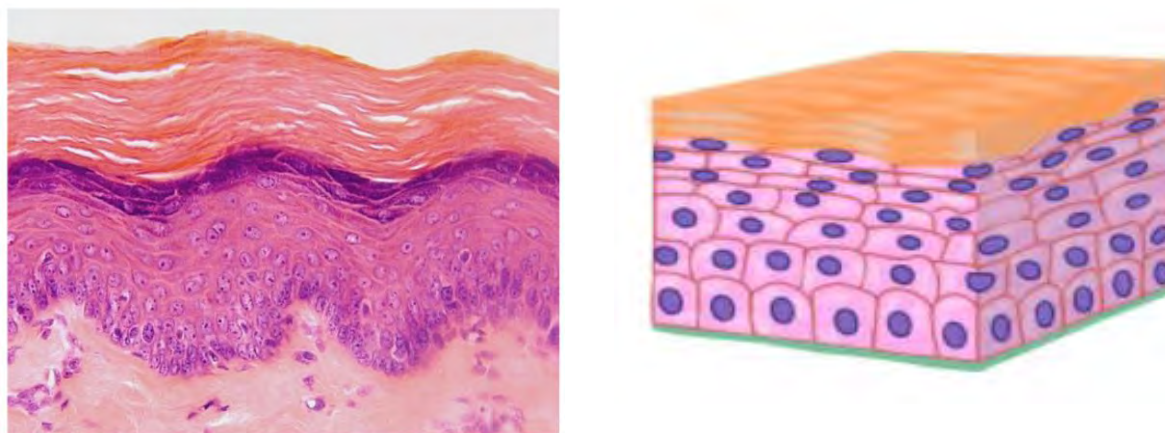


Fuente: Tejidos animales epitelios de revestimiento [en línea] Atlas de histología vegetal y animal. Disponible en internet: https://mmegias.webs.uvigo.es/guiada_a_revestimiento.php

En este apartado solo se describirá tejido epitelial plano estratificado ya que es el que corresponde a las muestras que se tomaron para estudio.

4.1.1.1 Morfología del epitelio estratificado plano (pavimentoso). Al corte perpendicular se observan varias capas de células, las cuales muestran forma variable. La capa basal está compuesta de células cuboides o cilíndricas, la capa media por un número variable de hileras de células más o menos poliédricas, y la capa superficial por célula planas o pavimentosas. Este tipo de epitelio se localiza en la epidermis, cavidad bucal, esófago, vagina y ano. En la epidermis el epitelio es seco, ya que las células superficiales se transforman en una capa inerte y resistente, denominada queratina y por presentar estas características se le denomina epitelio estratificado plano queratinizado. En la cavidad bucal, la vagina y el esófago, la superficie epitelial es húmeda y no posee queratina, por lo cual se plantea que es un epitelio estratificado plano húmedo. En general cumple funciones de protección, por su resistencia a la erosión y en alguna medida evita el intercambio de agua.

Figura 2. Esquema de la organización del epitelio estratificado plano queratinizado



Fuente: KRIERGER, Scott. Biología Celular y Molecular. 5 ed. Editorial Médica panamericana, p 80.

4.1.1.2 Especie *Eleutherodactylus Johnstonei* (Antillas coqui). Las pruebas realizadas se hicieron sobre tejido epitelial de anfibio de la familia Eleutherodactylida la cual cuenta con casi 700 especies al nivel global, se reportan para Colombia 210 especies²¹. Específicamente se estudió el *Eleutherodactylus Johnstonei* conocido comúnmente como Antillas coqui. Esta, especie nativa de las Antillas menores que ha sido introducida en el Caribe y el norte de Suramérica. En Colombia, esta especie se ha reportado en la ciudad de Barranquilla, Cartagena, Cali y Bucaramanga y ocupa el 10.5% de la extensión total del país; sin embargo²², *Eleutherodactylus johnstonei* es endémico de las Antillas Menores, y un colonizador de gran éxito con una amplia distribución en el Caribe, algunas regiones de Centroamérica y el norte de Sudamérica²³. Ocurre en áreas urbanas donde ha sido introducido accidentalmente por fenómenos naturales y por transporte humano involuntario. Se desconocen los impactos sobre las especies nativas sin embargo se plantea que puede entrar a competir con especies nativas como *Pristimantis palmeri*²⁰, ya que las dos especies tienen una preferencia de hábitat similar y que tienen vocalizaciones correlacionadas en un 70%, *E. johnstonei* es una especie de

²¹ ACOSTA, Andrés. Ranas, Salamandras y Caecilias (Tetrapoda: Amphibia) de Colombia. [en línea]. Pontificia Universidad Javeriana. Diciembre, 2000, vol. 1, no, 3, p. 289-319 [consultado 20 Noviembre 2016] Disponible en internet: <http://www.redalyc.org/pdf/491/49110303.pdf>

²² ORTEGA, Jesús Eduardo., et al. Reproduction of an Introduced Population of *Eleutherodactylus johnstonei* at Bucaramanga, Colombia. En: Copeia. Agosto, 2003, vol, 3, 642-648 p. 3.

²³ *Eleutherodactylus johnstonei* (Johnstone's Rain Frog). [en línea]. The Online Guide to the Animals of Trinidad and Tobago. November, 2014. 4 p. [consultado 20 de Noviembre 2016] Disponible en internet: https://sta.uwi.edu/fst/lifesciences/documents/Eleutherodactylus_johnstonei.pdf

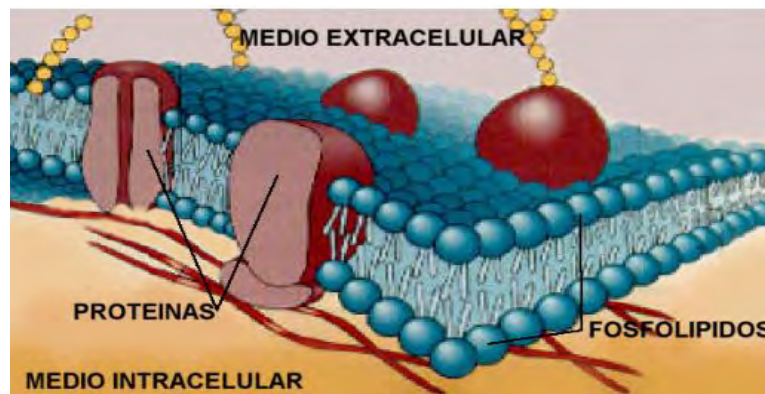
tamaño pequeño donde los machos pueden medir desde 17 a 25 mm de longitud y las hembras de 17 a 35 mm.

Se ha descrito como una especie que habita en zonas de alta intervención en los arbustos o en el suelo, de hecho se encuentra asociada a la vegetación baja de los jardines de las ciudades donde se ha introducido deliberadamente.

4.2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA BIOIMPEDANCIA

4.2.1 Propiedades eléctricas de los tejidos biológicos. La célula es una estructura compleja definida como la unidad anatómica y fisiológica fundamental de la vida. Uno de los principales componentes de las células es la membrana celular, que representa una barrera física entre el medio intracelular y extracelular, encargada del control osmótico, cuando se presenta un gradiente de concentración entre ambos medios, ya sea debido a un aumento o disminución de la cantidad de fluido, o bien al aumento o disminución de la concentración de iones disueltos en él; su estructura se basa en una bicapa lipídica en la cual se encuentran distribuidas las proteínas, permitiendo la transferencia de cargas eléctricas, principalmente iones, a través de ella, haciendo posible no sólo la comunicación entre ambos espacios, sino la generación de determinadas señales biológicas.

Figura 3. Estructura de la membrana celular



Fuente: SALAZAR MUÑOZ, Y. Introducción a la medida de impedancia eléctrica de tejidos biológicos. Capítulo 2. Disponible en internet: <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/93499/02Ysm02de07.pdf>

La mayoría de las células se unen entre sí mediante una matriz extracelular o bien por adhesión directa de una célula con otra formando distintas uniones. Estas agrupaciones celulares dan lugar a los tejidos, quedando entre ellas espacios llenos del líquido extracelular. Cada una de esas estructuras y

regiones poseen propiedades eléctricas muy particulares que dependiendo de su constitución y estado, determinarán la conducta de las propiedades eléctricas en función de la frecuencia.

Cuando se aplica un campo eléctrico constante, los iones cargados eléctricamente se mueven y se acumulan en ambos lados de la membrana. Sin embargo, cuando el campo es alterno, al aumentar la frecuencia, aparecen corrientes de desplazamiento a través de la pared celular, produciendo un fenómeno de relajación²⁴. Si la frecuencia de la corriente aplicada aumenta, la conductividad de la mayoría de los tejidos se incrementa desde un valor bajo en corriente directa, que depende del volumen extracelular, hasta un nivel constante en el rango de frecuencia desde 10 a 100 MHz.

En los tejidos biológicos sus características eléctricas como la respectiva variación de la permitividad y conductividad eléctrica de los mismos vienen determinadas, por tres efectos diferentes: las características de las células, ya sean sus propias características eléctricas, o la integridad y normalidad de las mismas. Por la variación de los volúmenes de los medios intra y extracelular. El último punto a considerar serán los efectos de doble capa que surgen al tratar con agrupaciones de elementos celulares²⁵ como es el caso de los tejidos biológicos.

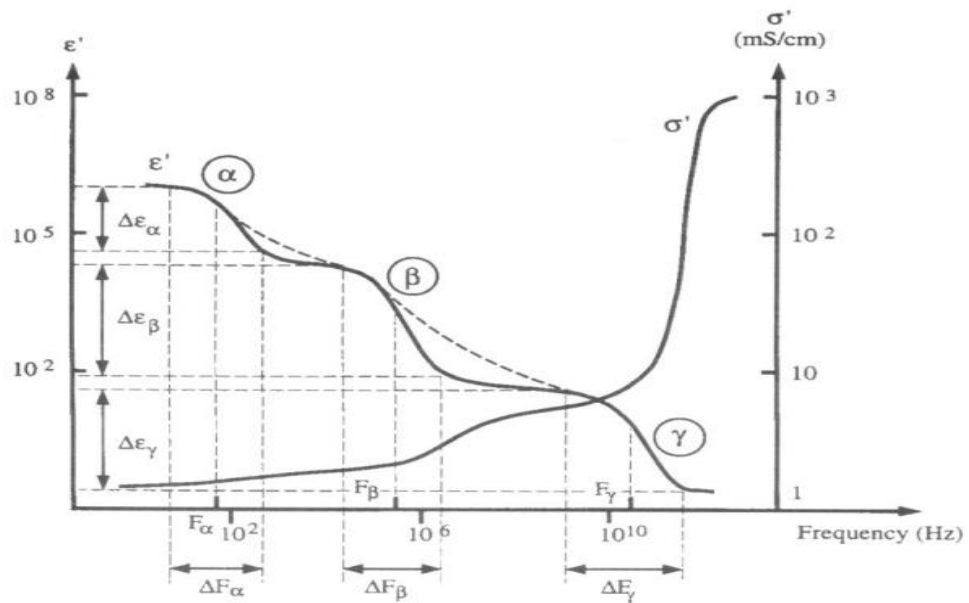
4.2.2 Dispersión en los tejidos biológicos. En los tejidos biológicos, como materiales dieléctricos que son, al ser expuestos a un campo eléctrico se generan en él procesos químicos y físicos. La representación eléctrica de este comportamiento puede ser descrita mediante dos propiedades principales: la conductividad (σ) y la permitividad (ϵ) eléctricas, se observa que a medida que se aumenta la frecuencia de la señal de excitación disminuye la permitividad y un aumento de la conductividad. Existen tres zonas de variación de la permitividad y la conductividad bien definidas, las cuales se denominan dispersión: alfa (α), beta (β), y gamma (γ), cada una caracterizada por un tipo de relajación²⁶. La Figura 2. Muestra las frecuencias de dispersión para el tejido biológico en función de la frecuencia.

²⁴ BROWN B. H *et al.* Modelled current distribution in cervical squamous tissue. En: *Physiol Meas*, U.K: October, 2001, vol, 23. p.6.

²⁵ FOSTER, K. and Schwan, H.P. Dielectric properties of tissues. In Polk, *Handbook of Biological Effects of electromagnetic Fields*. Physics Department, King's College, Strand, and London. p. 5

²⁶ C. Gabriel, S Gabriel. The dielectric properties of biological tissues: I. Literature Survey. En: *Physics in Medicine and Biology*. 2 April, 1996, vol, 41, no, 11, p.6

Figura 4. Conductividad y permitividad en función de la frecuencia



Fuente: MONCADA, María E., *et al.* Medición de impedancia eléctrica en tejido biológico. En: Revista Tecno Lógicas Diciembre, 2010, no, 25, p 6.

Para bajas frecuencias (inferior a cientos de kHz) la conductividad de los tejidos es dominada por conducción de electrolitos en el espacio extracelular. Los tejidos presentan la dispersión alfa (α) esta usualmente asociada con las numerosas interfaces membrana celular - electrolito en el tejido, donde se toman en consideración las cargas acumuladas con la formación de la doble capa electroquímica y la conducción iónica en los límites de la membrana. A frecuencias inferiores a la dispersión alfa, la permitividad relativa del tejido alcanza valores muy altos (decenas de millón) haciéndose más notable en la conductividad que en la permitividad. La dispersión (α) se manifiesta, por consiguiente, como un fenómeno superficial que no contiene información relacionada con el interior del tejido. La dispersión β se presenta en el rango de radio frecuencia (1kHz hasta 1MHz). Esta dispersión es esencialmente debida a mecanismos de carga capacitivos de las membranas celulares. Cuando la frecuencia aumenta, la reactancia capacitiva de la célula disminuye, lo cual induce un incremento en el flujo de corriente que circula a través del medio intracelular, y por consiguiente una disminución en la impedancia del tejido. Esta región se caracteriza por contener información sobre el interior de la célula, ya que la corriente aplicada atraviesa la membrana celular llegando hasta el componente intracelular. El valor típico en esta segunda zona de la conductividad es de 1 Sm^{-1} . La dispersión β se debe principalmente a la polarización de las membranas celulares que actúan como barreras al flujo de iones entre los medios intra y extracelulares. Otras contribuciones a la dispersión provienen de la polarización de proteínas y otras macromoléculas orgánicas. A frecuencias de microondas (sobre 1 GHz) los tejidos presentan la

dispersión gamma (γ) debido a la relación rotacional del tejido en el agua. Esta dispersión es centrada a 20 GHz y es la misma que se encuentra en el líquido de agua.

En este proyecto se abarcará solamente la relajación β , que comprende el rango en frecuencia de 1 kHz a 100 kHz, en el cual se ubican los tejidos blandos, en este caso tejido epitelial. La relajación β es la que está más estrechamente ligada a las propiedades de la membrana celular y a la agrupación de las células para formar diferentes tejidos.

4.2.3 Medición de conductividad y permitividad en los tejidos. La conductividad compleja (σ^*) y la permitividad compleja (ε^*), son propiedades eléctricas de los tejidos, son tensores, en donde sí se asume que el tejido es isótropo, lineal e independiente del tiempo se pueden considerar como escalares que están en función de la frecuencia.

Las propiedades dieléctricas de los materiales se obtienen de la medida de su permitividad compleja relativa, ε expresada como:

$$\varepsilon = \varepsilon' - j\varepsilon'' \quad (1)$$

Donde ε' es la permitividad relativa del material y ε'' el factor de pérdidas fuera de fase asociado con ella tal que:

$$\varepsilon'' = \frac{\sigma}{\varepsilon_0 \omega} \quad (2)$$

Donde ε_0 (F/m) es la permitividad del espacio libre, ω (rad/s) la frecuencia angular del campo y σ (S/m) es la conductividad total del material, la cual depende de la naturaleza de la muestra y además puede incluir una contribución de una conductividad iónica independiente de la frecuencia.

Una forma medir las propiedades dieléctricas de permitividad y conductividad de una muestra desconocida, es partir de la medición de una impedancia de prueba contra una muestra conocida usando las ecuaciones (3) y (4) desarrolladas por Gabriel en 1996²⁷:

²⁷ SALAZAR MUÑOZ, Y. Introducción a la medida de impedancia eléctrica de tejidos biológicos. Capítulo 2. Disponible en internet: <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/93499/02Ysm02de07.pdf>

$$\varepsilon' = \frac{C}{k} \quad (3)$$

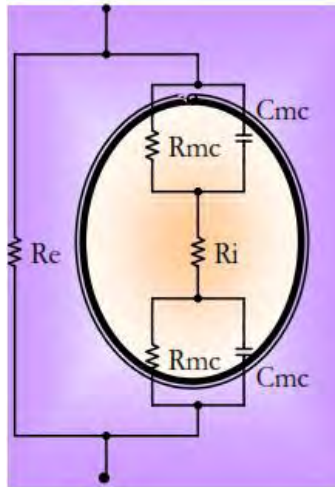
$$\sigma = \frac{G\varepsilon_0}{k} \quad (4)$$

Sin embargo, en la literatura orientada a la fisiología, frecuentemente las propiedades dieléctricas de los tejidos son representadas en series de formas equivalentes (como impedancia de tejido) más que en la forma de equivalente paralelo (permitividad compleja). No obstante, el proceso fundamental relacionado con el aumento de la densidad de carga y la conducción eléctrica ocurren en paralelo y las propiedades eléctricas de un material son presentadas en su mayoría como combinaciones paralelo de un capacitor (permitividad) y un elemento conductor (conductividad).

4.2.4 Modelamiento matemático y circuital del tejido. Una alternativa para la caracterización matemática de los tejidos, es la utilización de modelos circuitales a lo que en biomédica se le conoce como phantom, son circuitos eléctricos de dos terminales. En el estudio de bioimpedancia es ampliamente utilizado para tener una representación más clara de los procesos biológicos ya que estos se pueden asociar a priori a comportamientos de elementos resistivos y capacitivos, que a los coeficientes de ecuaciones matemáticas.

El modelo más sencillo es el de una célula inmersa en un medio extracelular iónico. En 1988, Rabbat presentó el paso de este sistema fisiológico sencillo a un circuito eléctrico equivalente. En este se modelaban los medios extra e intracelular, por elementos resistivos y la membrana por un efecto capacitivo en paralelo con otro resistivo como se puede observar en la siguiente figura.

Figura 5. Modelo que representa los principales mecanismos que determinan la impedancia de una suspensión celular



Fuente: SALAZAR MUÑOZ, Y. Introducción a la medida de impedancia eléctrica de tejidos biológicos. Capítulo 2. Disponible en internet: <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/93499/02Ysm02de07.pdf>

Siendo la resistencia del medio intracelular (R_i), la extracelular (R_e), la capacidad de la membrana celular (C_{mc}) Y su resistencia (R_{mc}).

Existen otras representaciones de modelos eléctricos, como son los representados por la ecuación compleja de Debye y los representados por la ecuación de Cole Cole como se menciona a continuación:

4.2.4.1 Descripción matemática de la relajación dieléctrica.

- **Ecuación de Debye.** Según lo propuesto por Debye, la relajación dipolar es un efecto de un proceso puramente viscoso, sin ninguna fuerza elástica de recuperación y por lo tanto, de primer orden. De hecho, la polarización, P_{or} , resultante de la aplicación de un campo eléctrico, E , los dipolos, puede definirse por ecuación diferencial.

$$\frac{dP_{or}}{dt} = \frac{1}{\tau} [P_s - P_{\infty} - P_{or}(t)] \quad (5)$$

Donde τ es el tiempo de relación, y P_{∞} y P_s son respectivamente la polarización instantánea (polarización rápida debida a las nubes eléctricas) y la polarización

mucho después de la aplicación de E. Dado que esta última es sinusoidal, la polarización de orientación es

$$P_{or}(\omega) = \frac{P_s - P_\infty}{1 + j\omega\tau} \quad (6)$$

Cuando ω es la frecuencia angular. La polarización resultante de la muestra es

$$P^*(\omega) = P_\infty + \frac{P_s - P_\infty}{1 + j\omega\tau} \quad (7)$$

Si se ignora la conductividad estática, la relajación dipolar puede ser explicada por la ecuación de Debye en su forma más simple.

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + j\omega\tau} \quad (8)$$

Donde ε_∞ y ε_s son la permitividad a alta y baja frecuencia respectivamente y τ es el tiempo de relajación²⁸.

En este modelo se ha hecho la aproximación de dieléctrico perfecto. Si éste no lo fuera, existiendo corrientes de conducción para $\omega=0$, sería necesario añadir al modelo el efecto de la conductividad estática σ_s , quedando la expresión completa.

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + j\omega\tau} - \frac{j\sigma_s}{\omega\varepsilon_0} \quad (9)$$

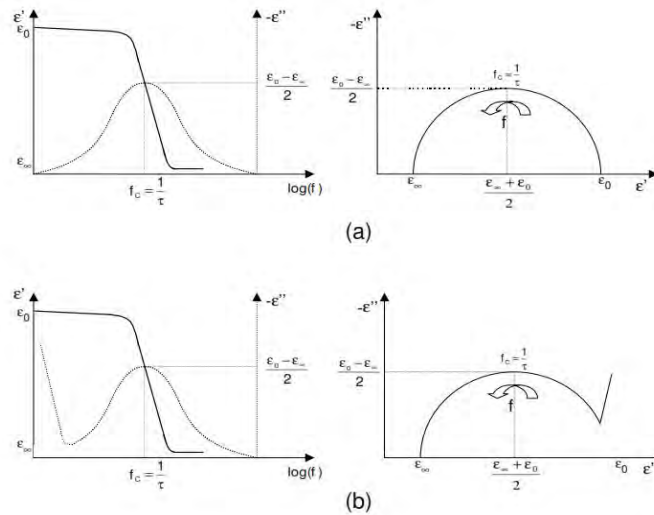
Siendo su representación, mediante diagramas de Bode y Nyquist, la que se muestra en la figura 6.

Este desarrollo es idéntico para la expresión de la conductividad compleja, llegándose a la ecuación

$$\sigma^*(\omega) = j\omega\varepsilon_0\varepsilon^* = \sigma_\infty \frac{\sigma_s - \sigma_\infty}{1 + j\omega\tau} + j\omega\varepsilon_0\varepsilon_\infty \quad (10)$$

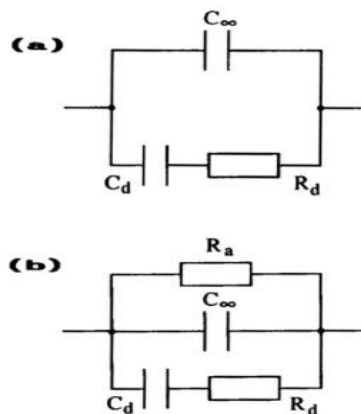
²⁸ C. Gabriel, S Gabriel ,Op. cit. p. 2

Figura 6. Representación de la ecuación de Debye(a) Diagrama de Bode y Nyquist para dieléctrico perfecto (b) considerando la pérdidas por corriente de conducción



Fuente: BOURNE John R. Bioelectrical Impedance Techniques in Medicine Critical Reviews in Biomedical Engineering. Vol. 24, Issues 4-6. New York. 1996. P. 280.

Figura 7. Circuito equivalente para la ecuación de Debye (b) modelo con conductividad estática considerada



Fuente: BOURNE John R. Bioelectrical Impedance Techniques in Medicine Critical Reviews in Biomedical Engineering. Vol. 24, Issues 4-6. New York. 1996. P. 281

- **Ecuación de Cole.** En la práctica, las ecuaciones de Debye no permiten modelar bien los medios heterogéneos, tales como los tejidos biológicos, ya que la relajación dieléctrica de la mayoría de las sustancias biológicas es más complicada e implica varias constantes de tiempo. La mayor parte de las curvas del $\varepsilon''(\varepsilon')$ obtenidas de los tejidos biológicos, no corresponden al semicírculo descrito anteriormente: el valor del máximo de ε' es menor que $1/2 (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)$. Se ha propuesto un gran número de funciones de relajación empírica para describir el comportamiento eléctrico de los tejidos, que se interpreta generalmente mediante una distribución de las constantes de tiempo de relajación, pero también es modelado por una estructura fractal o por la presencia de varias interfaces.

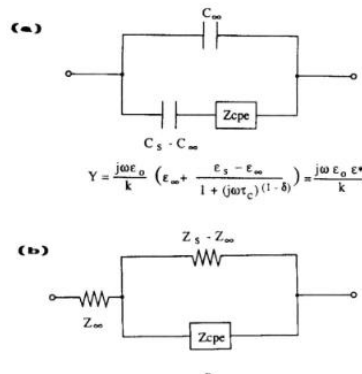
La función de relajación que probablemente ha sido la más utilizada es la propuesta por Cole en 1940, la cual se basa en una distribución de constantes de tiempo de relajación, lo que permite abordar experimentalmente el comportamiento dieléctrico de los tejidos. La permitividad compleja es así dada por la ecuación de Cole denominada la ecuación de 'Cole - Cole' después de Cole y Cole.

$$\varepsilon^* = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + j\omega(\tau_c)^{(1-\alpha)}} - j \frac{\sigma_s}{\omega \varepsilon_0} \quad (11)$$

Donde α es un parámetro empírico característico de la distribución de la frecuencia de relación, $fc(\tau_c = 1/2\pi f_c)$ dando una idea del grado de dispersión de las constantes de tiempo asociadas con el fenómeno de relajación. De esta forma, se encuentra una forma análoga para la impedancia:

$$Z = R\alpha + \frac{R_0 - R\alpha}{1 + j\omega(\tau_c)^{(1-\alpha)}} \quad (12)$$

Figura 8. Circuito eléctrico modelado con la ecuación para permitividad (b) impedancia



Fuente: BOURNE John R. Bioelectrical Impedance Techniques in Medicine Critical Reviews in Biomedical Engineering. Vol. 24, Issues 4-6. New York. 1996. P. 285

La figura anterior presenta un modelo eléctrico equivalente a la ecuación Cole. Este modelo se deriva del modelo de Debye (Figura 7b) en donde R_d se sustituye por una impedancia (Z_{cpe}) que presenta un comportamiento de ley de potencia fraccional.

4.2.5 Impedancia de Electrodo. Para registrar biopotenciales se necesita un elemento que haga interfaz entre el cuerpo y el equipo de medida, este elemento es el electrodo. Los electrodos son los elementos transductores entre la corriente eléctrica del equipo de medida y la corriente iónica del tejido biológico. Una de las principales características es que deben presentar muy baja impedancia de entrada para reducir las tensiones parásitas inducidas. Los electrodos más usados para la medición de fenómenos bioeléctricos son tres: a) micro-electrodos, utilizados para medir potenciales bioeléctricos cerca o dentro de una célula; b) electrodos superficiales, utilizados para medir potenciales en la superficie de la piel, usados en electrocardiograma (ECG), electroencefalograma (EEG) y electro miografía (EMG) y c) electrodos de aguja, estos atraviesan la piel para el registro de potencial y son usados para mediciones EEG o musculares específicas.

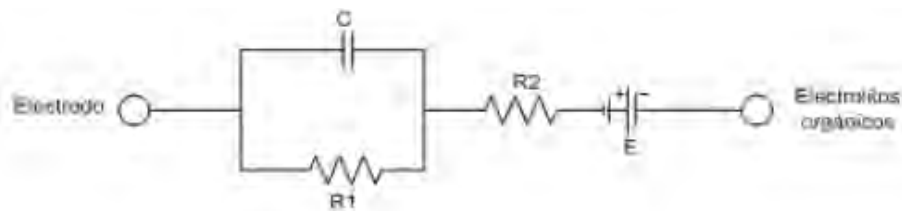
La impedancia del electrodo puede ser modelada por una resistencia (R) y una reactancia (X) en serie, cuyo valor decrece cuando la frecuencia se incrementa.

$$Z_e = R - jX \quad (13)$$

A pesar de que se puedan identificar los parámetros de impedancia del electrodo, no se puede determinar un modelo preciso, ya que la magnitud depende del metal del electrodo, de su área, del electrolito utilizado, de la densidad de la corriente y de la frecuencia de la corriente utilizada en las medidas.

Sin embargo, se puede modelar teniendo en cuenta la doble capa del interfaz como un condensador. En la Figura 9 se muestra el circuito equivalente del electrodo para biopotenciales en contacto con el cuerpo (tensión en serie con una red de resistencias y condensador). Dado que las medidas de los potenciales bioeléctricos requieren dos electrodos, la tensión medida es en realidad la diferencia entre los potenciales instantáneos de ambos.

Figura 9. Circuito equivalente de electrodo para biopotencial.



Fuente: MONCADA, María E; ., *et al.* Medición de impedancia eléctrica en tejido biológico. En: Revista Tecno Lógicas. Diciembre, 2010, no, 25, p.10

4.2.5.1 Potenciales característicos en los electrodos. Cuando un metal entra en contacto con un electrolito ocurren intercambios ion-electrolito. Los iones metálicos tienden a entrar en la solución y los iones del electrolito tienden a combinarse con los electrones metálicos a lo que se denomina reacciones de óxido-reducción. Como resultado surge una distribución de cargas en la superficie de contacto. Esto da lugar a lo que se llama potencial de media celda cuando no existe flujo de corriente a través de la interfaz.

4.2.6 Circuitos para medir bioimpedancia.

4.2.6.1 El puente de impedancia. Es una extensión de la versión clásica **puente de Wheatstone** de resistividad - se aplica ampliamente en los laboratorios de investigación. En él, la impedancia (Z_b) forma una de las ramas del puente, funcionando confiablemente sobre una gama de frecuencia ancha (dc a 300MHZ). Cole y Curtis lo utilizaron para demostrar cambios de impedancia transmembrana durante el potencial de acción del nervio. También

fue el instrumento principal en los estudios realizados por Geddes²⁹ para determinar los componentes de la serie electrodo-electrolito interfaz. Recientemente, Felice³⁰ fue capaz de separar con él la contribución de impedancia media y de interfaz durante el crecimiento bacteriano.

Uno de los problemas de esta configuración es que en ocasiones no es fácil equilibrar el puente, o incluso puede ser imposible alcanzar un equilibrio completo, especialmente si la frecuencia de conducción es alta. Otro problema es el punto de referencia: si uno de los generadores está conectado a tierra, el lado de detección no puede estar conectado a esta, o viceversa, lo que genera ruido forzando y es necesario implementar una tierra virtual, complicando así el circuito y su funcionamiento. En otras palabras, el puente de impedancia no es una configuración tecnológicamente práctica para mediciones rápidas, aunque puede alcanzar una alta exactitud y precisión.

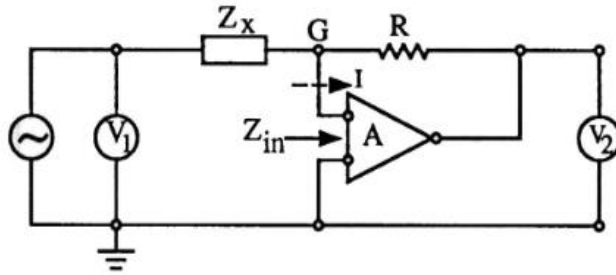
4.2.6.2 Resonancia. Un segundo tipo de disposición aplica el principio de resonancia para medir Z_b . Una inductancia tiene que ser ajustada hasta que se obtiene la corriente máxima o la tensión, dependiendo de la configuración específica del circuito. Las frecuencias pueden oscilar entre 70kHz y 70MHz. Los valores para R_b y C_b (es decir, para Z_b) se derivan de la inductancia y la lectura de frecuencia y la aplicación de la ecuación del circuito. No se utiliza en biología debido a sus muchos inconvenientes: el espectro de frecuencia es limitado, las inductancias variables no son prácticas, y el voltaje o corriente resonante puede producir daño tisular.

4.2.6.3 Puente activo equilibrado. La figura 10 representa su principio de operación en donde V_1 y V_2 son voltímetros y A es un amplificador operacional con impedancia de entrada muy alta Z_{in} . Como consecuencia, el punto G se comporta como un tierra virtual. El módulo de $Z_x = R$ cuando $V_1 = V_2$, dado que la corriente de entrada del amplificador es esencialmente cero y por tanto, la corriente I a Z_x y R es la misma. El rango de frecuencias de este circuito se encuentra entre 5Hz y 40MHz, siendo las características del amplificador operacional la principal limitación. A pesar de esto, este sistema no es el adecuado para la grabación continua y para la detección de eventos rápidos, como es el caso en la mayoría de los fenómenos biológicos. Otra desventaja es una posible desviación en la salida del amplificador, requiriendo así una electrónica más sofisticada.

²⁹ Geddes I. The impedance of stainless steel electrodes. [en línea]. En: Medical and Biological Engineering and Computing. 1971, vol. 9, no. 5, p. 511-521. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5159049>

³⁰ BOURNE John R., Op. cit. p. 246

Figura 10. Método auto-equilibrado



Fuente: BOURNE John R. Bioelectrical Impedance Techniques in Medicine Critical Reviews in Biomedical Engineering. Vol. 24, Issues 4-6. New York. 1996. p. 260

En biología o fisiología, el método más común y más simple para medir impedancia es a través de la medición de voltaje y corriente. Existen tres métodos comúnmente utilizados para esto: el método a 2 electrodos o bipolar (2EM, del inglés 2 Electrode Method) y el método de 4 electrodos o tetrapolar (4EM, del inglés 4 Electrode Method). Una variante de los métodos anteriores es el método a 3 electrodos (3EM, del inglés 3 Electrode Method). Cada uno de estos métodos se describe a continuación:

4.2.6.4 Método a dos electrodos (2EM). La figura 11 ilustra el principio. Un generador de corriente constante que puede ser formado por el generador de voltaje, E , con frecuencia, f , y dos resistencias iguales y simétricas (o simplemente una resistencia) - inyecta la corriente I a la impedancia bajo estudio, $Z_b = Z_0 + \Delta Z$. El último término, ΔZ , significa la porción variacional de la impedancia biomédica. La corriente constante es una condición indispensable para obtener una relación proporcional entre el valor de salida y la impedancia. Por esta razón, la resistencia del generador y de la serie siempre debe ser mucho mayor que la impedancia biológica bajo medición. Frecuencia, f , actúa como portador, lo que significa que un amplificador adecuado debe ser seguido por un sistema de rectificación (o detección o demodulación) para producir la salida final. La información de valor biológico está contenida en la onda de modulación de baja frecuencia. Así:

$$E_s = I(Z_0 + \Delta Z) = \frac{EZ_B}{2R + Z_B} \quad (14)$$

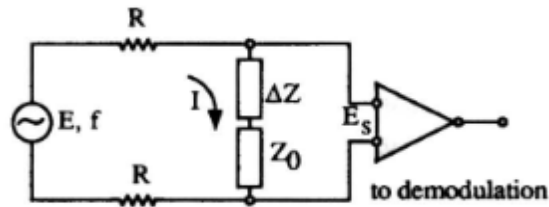
Si $2R \gg Z_B$ and $\Delta Z < Z_0$ entonces

$$E_s \approx (E/2R) [Z_0 + \Delta Z]$$

La salida seria

$$E_s = E_0 + \Delta E \quad (15)$$

Figura 11. Configuración Método a dos electrodos (2EM)



Fuente: BOURNE John R. Bioelectrical Impedance Techniques in Medicine Critical Reviews in Biomedical Engineering. Vol. 24, Issues 4-6. New York. 1996. p. 261

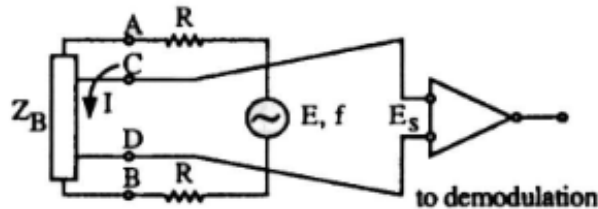
4.2.6.5 Método de 4 electrodos o tetrapolar (4EM). Este método fue introducido por Bouty en 1884. La disposición básica se muestra en la figura 12, también con corriente constante, I de frecuencia, f , inyectada a través de los puntos A y B del tejido biológico. Mediante un amplificador, a su vez conectado a la unidad de demodulación y finalmente al sistema de salida (voltímetro, registrador, osciloscopio u ordenador), se realiza la medición de tensión entre los puntos C y D. Adecuadamente aplicado, este circuito se encarga de los errores debidos a las interfaces electrodo / electrolito.

Con la configuración tetrapolar, la corriente entra en el tejido a través de dos electrodos de inyección (electrodos de corriente) mientras que la señal es captada por un segundo par de electrodos (electrodos de tensión). La corriente inyectada es independiente de la impedancia de la interfaz electrodo / electrolito y de la impedancia biológica. Esta condición se satisface mejor cuando la impedancia de la fuente de corriente es grande en comparación con la suma de la interfaz y la impedancia del tejido. Si los electrodos de corriente están situados más lejos de los electrodos de voltaje, los dos últimos podrían detectar una señal en una región con una distribución más uniforme de las líneas de corriente, favoreciendo así una relación lineal de salida / entrada. Cerca de los electrodos de inyección (especialmente si son pequeños), la densidad de corriente es mayor y menos uniforme que en las regiones más distantes. Pero, las limitaciones anatómicas o de tamaño pueden imponer restricciones prácticas a estas condiciones deseables.

Por las razones mencionadas anteriormente, este circuito es casi inmune a los artefactos de movimiento o a cambios en la impedancia de las interfaces, contrariamente a la disposición bipolar (que es altamente sensible a ese tipo de

interferencia). Por lo tanto, se recomienda para los registros fisiológicos durante el movimiento, como en el ejercicio físico o cualquier situación similar.

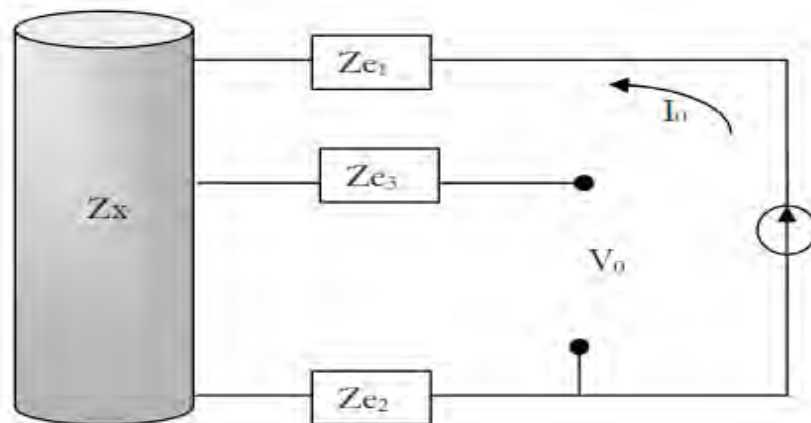
Figura 12.Configuración Método de 4 electrodos o tetrapolar (4EM)



Fuente: BOURNE John R. Bioelectrical Impedance Techniques in Medicine Critical Reviews in Biomedical Engineering. Vol. 24, Issues 4-6. New York. 1996. p. 261

4.2.6.6 Método de tres electrodos (3EM). El método de tres electrodos mezcla los dos métodos anteriores donde una corriente (I_0) pasa a través de dos electrodos: un electrodo inyector de corriente (Ze_1) y un electrodo de referencia (Ze_2). Esta corriente fluye a través del tejido. La tensión (V_0) corresponde a la caída de tensión provocada por la corriente que se aplica a la impedancia de interés (Z_x) y el segundo electrodo (Ze_2).

Figura 13.Configuración del método a 3 electrodos (3EM)



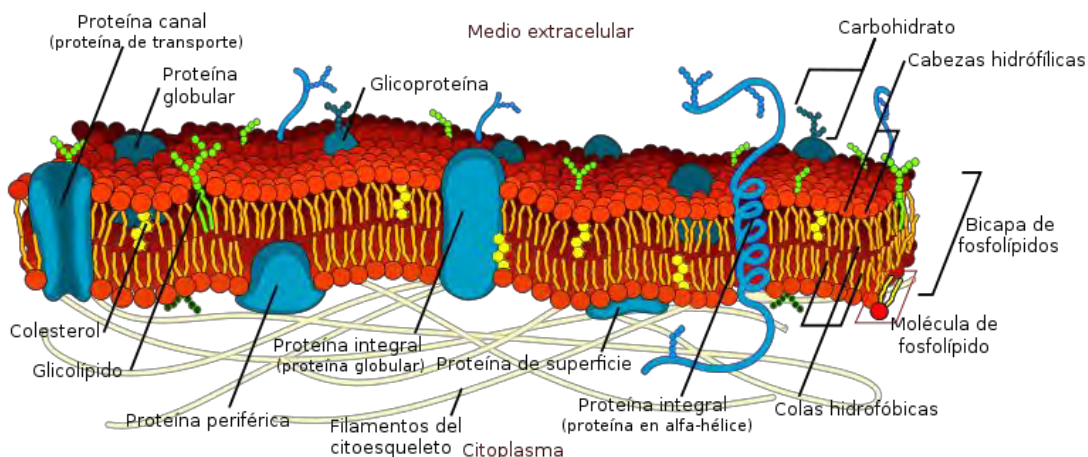
Fuente: SALAZAR MUÑOZ, Y. Introducción a la medida de impedancia eléctrica de tejidos biológicos. Capítulo 2. Disponible en: <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/93499/02Ysm02de07.pdf>

4.3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA TÉCNICA VOLTAGE CLAMP

4.3.1 Membrana plasmática, estructura y función de las proteínas de membrana. Las células se encuentran rodeadas por una fina pero contundente barrera que regula la permeabilidad de las mismas, conocida como membrana plasmática. Esta membrana separa el contenido celular de la solución diluida de sales en agua llamada líquido intersticial, o simplemente líquido tisular. Las membranas impiden el libre intercambio de materiales del espacio intracelular al extracelular o viceversa, pero al mismo tiempo proporcionan el medio para comunicar un espacio con otro. La membrana plasmática debe garantizar que las sustancias apropiadas penetren al citoplasma desde el espacio externo y las sustancias inapropiadas salgan de la célula. En esta función, la membrana plasmática actúa como barrera selectivamente permeable.

4.3.2 Estructura de la membrana Desde hace más de 50 años se sabe que la membrana está compuesta principalmente por lípidos y proteínas. El verdadero núcleo de la membrana consiste en una vaina de fosfolípidos dispuestos en una capa bimolecular, una bicapa de lípidos (Figura 14). Las bicapas de lípidos sirven principalmente como armazón estructural para la membrana y como barrera que impide movimientos desordenados de materiales hidrosolubles hacia adentro y afuera de la célula.

Figura 14. Membrana celular



Fuente: KRIERGER, Scott. Biología Celular y Molecular. 5 ed. Editorial Médica panamericana, p. 180

Las proteínas de la membrana, por otra parte, efectúan la mayor parte de las funciones. Las proteínas a nivel transmembranal, periféricas y acopladas a lípidos por enlaces covalentes, las cuales varían dependiendo el tipo de célula. Cada proteína de la membrana posee una orientación definida en relación

con el citoplasma para que las propiedades de la superficie de la membrana sean muy distintas respecto de las de otras superficies que podemos encontrar en el organismo.³¹

Las proteínas cumplen funciones vitales para el desarrollo y funcionamiento de la célula, pero hay un selecto grupo como lo son las proteínas integrales de membrana, que se encarga de funciones como: ser receptores que se unen a sustancias específicas en la superficie de la membrana, como canales o transportadores implicados en el movimiento de iones y solutos a través de la membrana, o agentes que transfieren electrones durante los procesos de fotosíntesis y respiración³².

4.3.3 Movimiento de sustancias a través de membranas celulares. El contenido de la célula está rodeado en toda su extensión por la membrana plasmática, la comunicación entre la célula y el medio extracelular debe ser a través de esta la membrana. Esto conlleva a la doble responsabilidad de la membrana que por un lado, debe retener los materiales disueltos dentro de la célula, de modo que no salgan de la misma por simple escurrimiento hacia el medio; por otra parte, debe permitir el intercambio necesario de materiales hacia adentro y afuera de las células.

La bicapa de lípidos de la membrana es ideal para prevenir la pérdida de solutos polares con carga eléctrica de una célula, pero deben tenerse algunas precauciones en relación con el ingreso de nutrientes y la salida de productos de desperdicio que pudieran ser bloqueados por la bicapa de lípidos relativamente impermeable. Como ya se mencionó, la membrana plasmática es una barrera con permeabilidad selectiva, es decir, no es igualmente permeable a todo tipo de solutos. Esta selectividad permite que la concentración de sustancias dentro de las células sea notablemente diferente de su concentración en el exterior, condición necesaria para la vida de una célula.

Para entender la naturaleza selectivamente permeable de la membrana plasmática es necesario considerar cómo atraviesan esta estructura las moléculas individuales. Básicamente hay dos medios para dicho movimiento: por transporte pasivo o por algún tipo de transporte activo acoplado a energía. Ambos tipos de movimiento pueden producir flujo neto de un ion o compuesto particular. El término flujo neto indica que el movimiento de la sustancia al interior de la célula (*flujo interno*) y hacia afuera de la misma (*flujo externo*) no está en equilibrio, sino que más bien uno excede al otro.

³¹KRIERGER, Scott. Biología Celular y Molecular. 5 ed. Editorial Médica panamericana, p.180.

³² DE ROBERTIS, Eduardo. Hi, Jose. Fundamentos de biología celular y molecular de Robertis. 4 ed. Buenos Aires: Editorial el Ateneo, 2004. p.120.

4.3.3.1 Transporte Pasivo. El transporte pasivo es el intercambio simple de moléculas a través de la membrana plasmática, durante el cual la célula no gasta energía, debido a que va a favor del gradiente de concentración o a favor de gradiente de carga eléctrica, es decir, de un lugar donde hay una gran concentración a uno donde hay menor. El proceso celular pasivo se realiza por difusión.

- **La difusión.** La difusión es un proceso en el que una sustancia se mueve de una región de alta concentración a otra con baja concentración, lo que al final elimina la diferencia de concentración entre las dos regiones. El paso de sustancias a través de la membrana está asociado al movimiento térmico aleatorio de solutos y es un proceso exergónico, lo cual hace que el proceso tenga un cambio de entropía positiva.³³

- **Tipos de difusión**

- **Difusión simple:** Significa que la molécula puede pasar directamente a través de la membrana. La difusión es siempre a favor de un gradiente de concentración. Esto limita la máxima concentración posible en el interior de la célula (o en el exterior si se trata de un producto de desecho). La efectividad de la difusión está limitada por la velocidad de difusión de la molécula. Por lo tanto, si bien la difusión es un mecanismo de transporte suficientemente efectivo para algunas moléculas (por ejemplo el agua), la célula debe utilizar otros mecanismos de transporte para sus necesidades. Difusión simple a través de canales: se realiza mediante las denominadas proteínas de canal. Así entran iones como el Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻. Las proteínas de canal son proteínas con un canal interno, cuya apertura está regulada.

Mediante difusión simple a través de la bicapa entran moléculas lipídicas como las hormonas esteroideas, anestésicos como el éter y fármacos liposolubles. Y sustancias apolares como el oxígeno y el nitrógeno atmosférico. Algunas moléculas polares de muy pequeño tamaño, como el agua, el CO₂, el etanol y la glicerina, también atraviesan la membrana por difusión simple. La difusión del agua recibe el nombre de ósmosis

- **Difusión facilitada.** Algunas moléculas son demasiado grandes como para difundir a través de los canales de la membrana y demasiado insolubles en lípidos como para poder difundir a través de la capa de fosfolípidos. Tal es el caso de la glucosa y algunos otros monosacáridos. Estas sustancias, pueden cruzar la membrana plasmática mediante el proceso de difusión facilitada, con

³³ GERALD, Karp. Biología celular y molecular: Conceptos y experimentos. 5 ed. McGrawHill. p.142.

la ayuda de una proteína transportadora. En el primer paso, la glucosa se une a la proteína transportadora, y esta cambia de forma, permitiendo el paso del azúcar. Tan pronto como la glucosa llega al citoplasma, una enzima que añade un grupo fosfato a un azúcar, (Kinesa) transforma la glucosa en glucosa-6-fosfato. De esta forma, las concentraciones de glucosa en el interior de la célula son siempre muy bajas, y el gradiente de concentración del exterior al interior favorece la difusión de la glucosa. La difusión facilitada es mucho más rápida que la difusión simple y depende:

Del gradiente de concentración de la sustancia a ambos lados de la membrana
Del número de proteínas transportadoras existentes en la membrana
De la rapidez con que estas proteínas hacen su trabajo.

- **Difusión de iones a través de las membranas.** La bicapa de lípidos que forma el centro de las membranas biológicas es muy permeable a sustancias con carga eléctrica, incluyendo iones pequeños como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- . Incluso el movimiento (conductancia) de estos iones a través de las membranas desempeña un papel crítico en múltiples actividades celulares, que comprenden generación y propagación de impulsos nerviosos, secreción de sustancias hacia el espacio extracelular, contracción muscular, regulación del volumen celular. Hace más de 40 años, Alan Hodgkin, Bernard Katz y Andrew Huxley, tres fisiólogos ingleses, trabajando con un axón gigante de células nerviosas de calamar, propusieron por primera vez que las membranas celulares contenían canales iónicos permeables a iones específicos³⁴.

En la actualidad, los biólogos han identificado un sorprendente número de canales iónicos, cada uno formado por proteínas integrales de la membrana que rodean un poro acuoso. La mayor parte de los canales iónicos son sumamente selectivos y sólo permiten el paso de un tipo particular de ion. Igual que en la difusión de otros tipos de solutos a través de membranas, la difusión de iones por un canal siempre va de un estado de mayor energía a otro de menor energía. Los canales iónicos son *bidireccionales*, permiten el paso de iones en ambas direcciones y el flujo neto del ion depende del gradiente electroquímico. La comprensión de la estructura y la operación de los canales iónicos se han desarrollado más en años recientes gracias al gran avance tecnológico, que incluye el desarrollo de técnicas mediante las cuales se pueda estudiar la conductancia de iones a través de un solo canal iónico, una de estas nuevas tecnologías es el Voltage Clamp una de la técnicas en las que se fundamenta este proyecto.

³⁴ GERALD, Karp ,Op. Cit. p. 142

4.3.3.2 Transporte activo. Finalmente se tiene el transporte activo o transporte dependiente de energía. El transporte activo de solutos en contra del gradiente electroquímico es esencial para el mantenimiento de la composición iónica intracelular y para importar solutos que se encuentra en una menor concentración en el exterior que en el interior de las celular.

Las ATPasas más conocidas son las bomba sodio y potasio que se encuentran en casi todas las células animales y la H ATPasa que es responsable de la acidificación del jugo gástrico. En la membrana plasmática de una célula animal, una bomba impulsada por ATP transporta el Na^+ hacia el exterior de la célula en contra de su gradiente electroquímico y luego el Na^+ reingresa en la célula a favor de su gradiente. Dado que los iones Na^+ fluyen mediante transportadores acoplados al Na^+ , el ingreso de Na^+ en el interior de la célula impulsa el pasaje activo de muchas otras sustancias hacia el interior celular en contra de sus respectivos gradientes electroquímicos. De este modo, si la bomba de Na^+ dejara de funcionar, el gradiente de Na^+ desaparecería en un lapso breve y el transporte por transportadores acoplados al Na^+ se interrumpiría. En consecuencia, la bomba de Na^+ impulsada por ATP es vital para el transporte de membrana en las células animales.

- **Bomba Na^+ , K^+ ATPasa.** Se piensa que esta proteína evolucionó en los animales primitivos como principal medio para conservar el volumen celular y como mecanismo para generar los pronunciados gradientes de Na^+ y K^+ que desempeñan un papel tan importante en la generación de impulsos en células nerviosas y musculares.

Básicamente el funcionamiento de la bomba se desarrolla en cinco pasos claves: 1) El primer paso tiene que ver con la unión del sodio, 2) seguidamente, de cara al citoplasma se da la fosforilación del ATP, lo cual conlleva a un cambio conformacional de la glicoproteína, posteriormente el siguiente paso 3) conlleva a que se transferencia del sodio a través de la membrana y lo libera en el exterior. 4) Posteriormente se da el acople del potasio a la cara extracelular y 5) la posterior desfosforilación devuelven la proteína a su conformación original, lo que 6) facilita la transferencia del potasio a través de la membrana y lo libera al citosol³⁵.

Como se ha podido observar los canales de las la membrana cumplen un papel indispensable en la célula, por lo tanto, la dependencia de voltaje de la activación (e inactivación) del canal, así como las velocidades que los canales abren, cierran e inactivan a diferentes voltajes, necesitan ser medidas. Dichas mediciones sólo pueden realizarse utilizando métodos de Voltage Clamp.

³⁵GERALD, Karp ,Op. Cit. p. 145

4.3.4 Cámara Ussing Para estudiar el paso de iones, Hans H. Ussing en 1949 publica Acta Physiol 17:1 y en 1951 Acta Physiol Scand en las que reporta el diseño de una cámara compuesta por dos compartimentos de plástico separados entre sí, los cuales permiten colocar entre ambos un epitelio aislado, como se muestra en la Fig. 9 A) donde se puede medir la diferencia de potencial entre ambas caras del epitelio, poniendo a prueba diferentes sustancias introducidas por los conductos de vidrio³⁶.

Figura 15. Camara Ussing



Fuente: DIAZ, Elver. Establecimiento de un sistema de registro de transporte de sodio transepitelial, empleando como biomodelo la piel de *eleutherodactylus johnstonei*. Trabajo de grado de químico farmacéutico. Santiago de Cali: Universidad ICESI, Facultad de ciencias naturales. 2014. 58 p.

4.3.5 Voltage Clamp. El Voltage Clamp es una técnica electrofisiológica para registrar las corrientes eléctricas en las membranas biológicas. Se basa en el principio de que la corriente que fluye a través de una membrana celular puede

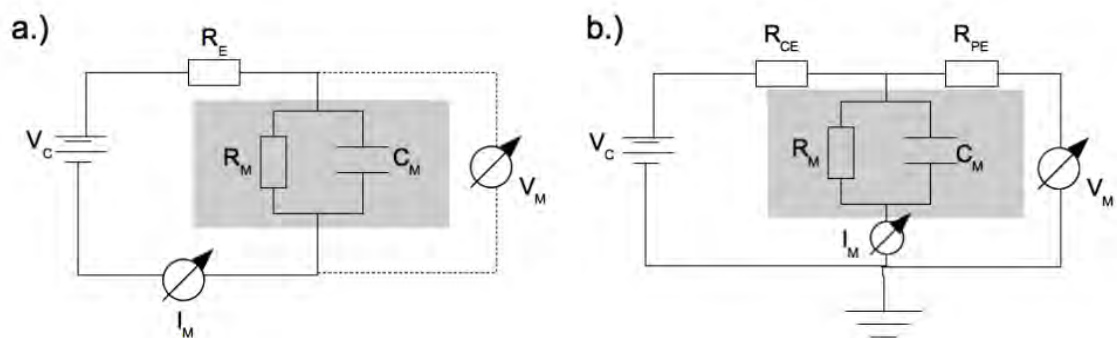
³⁶ DIAZ, Elver. Establecimiento de un sistema de registro de transporte de sodio transepitelial, empleando como biomodelo la piel de *eleutherodactylus johnstonei*. Trabajo de grado de químico farmacéutico. Santiago de Cali: Universidad ICESI, Facultad de ciencias naturales. 2014. p. 50.

estimarse "sujetando" el potencial de membrana a un valor constante usando la inyección de una corriente.

En la práctica, el método se utiliza principalmente para caracterizar las conductancias dependientes de la tensión en la membrana de las neuronas mediante sujeción de las células a diferentes potenciales de escalonamiento. La pinza se consigue con un circuito que detecta rápidamente desviaciones del potencial de escalonamiento y genera corrientes para corregir esta desviación.

- **Voltage Clamp ideal.** El Voltage Clamp ideal consiste simplemente en una batería, un cable, la célula y un amperímetro como se puede observar en la figura 16a, partiendo de la base de que el cable tiene cero resistencias, cuando el potencial de membrana pasa instantáneamente a ser igual al voltaje de la batería. Esto genera un impulso de corriente que carga el capacitor de la membrana, seguido por una corriente de mantenimiento a través de la resistencia de la membrana.³⁷

Figura 16. (a))Voltage Clamp ideal (b)Voltage clamp real



Fuente: DIETER, Jaeger. Ranu, Jung. Encyclopedia of Computational Neuroscience. New York: Springer Science, 2015. p. 1060

En la figura 16a se asume $R_E = 0$, este esquemático cuenta con una fuente de tensión que proporciona el potencial de sujeción V_C , la membrana modelo y un amperímetro para medir la corriente de membrana I_M . Este circuito es "ideal" si se desprecian las resistencias intrínsecas de los cables, el amperímetro y la batería. Por lo tanto, la caída de potencial a través de la V_M de membrana modelo es igual al potencial de la batería ($V_M = V_C$).

³⁷ BOURNE John R., Op. cit. p. 248

- **Voltage Clamp Real.** En un Voltage Clamp real, las conexiones dentro del circuito electrónico no pueden ser tratadas con resistencias insignificantes. En particular, la resistencia del electrodo R_{CE} (figura 16b) no puede ser despreciada, y las dos resistencias, R_{CE} y R_M , en serie actúan como divisor de voltaje. La caída de potencial a través de la membrana viene dada por la siguiente ecuación:

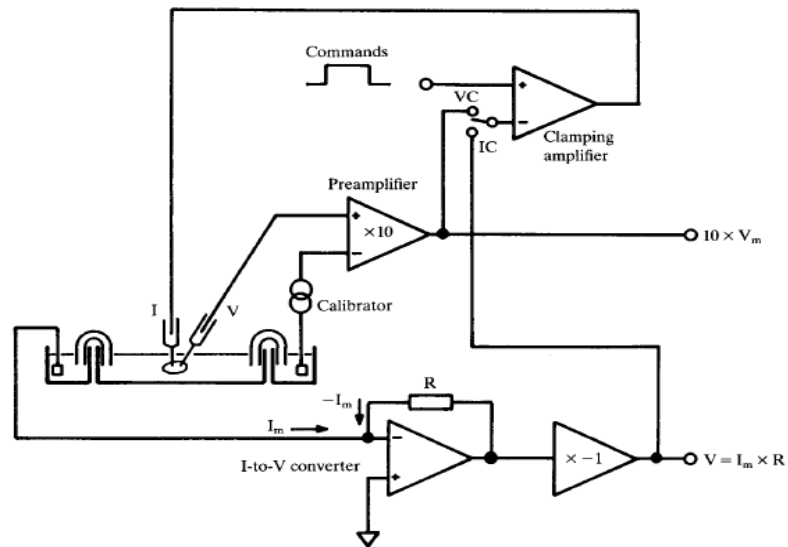
$$V_M = \frac{R_M}{R_M + R_{CE}} V_C \quad (16)$$

Al asumir R_{CE} con un valor significativo, se necesita un segundo electrodo para determinar el potencial de membrana real. En el laboratorio se utilizan microelectrodos de vidrio para penetrar en la membrana celular para acceder al interior de la célula. Estos electrodos tienen resistencias de punta en el rango de $M\Omega$ similar a la resistencia de entrada de células grandes.

4.3.6 Voltage Clamp de dos electrodos. En esta configuración la célula es penetrada por dos microelectrodos, uno se encarga de registrar el tensión y el otro introduce la corriente. Los microelectrodos son diseñados especialmente para disminuir sus resistencias (5-10 $M\Omega$ para los de tensión y 1-2 $M\Omega$ para corriente) y para generar poco daño en la célula. Un preamplificador registra el potencial de membrana y el amplificador diferencial del Clamp ingresa corriente para controlar este potencial.³⁸

³⁸ HALLIWELL, James V. Plant, Tim D. Robbins, Jon. Standen, Nick B. Voltage clamp techniques. The University of Texas, Dallas.[consultado en Enero 2016] Disponible en internet: http://www.utdallas.edu/~tres/microelectrode/microelectrodes_ch02.pdf

Figura 17. Circuito de fijación de tensión de dos electrodos. El circuito puede ser conmutado o bien a fijación de voltaje (VC) o la corriente (IC).



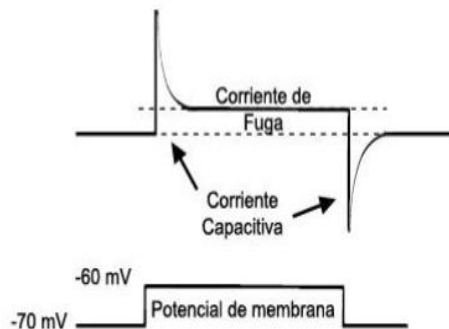
Fuente: HALLIWELL, James V. Plant, Tim D. Robbins, Jon. Standen, Nick B. Voltage clamp techniques. The University of Texas, Dallas. Disponible en internet: http://www.utdallas.edu/~tres/microelectrode/microelectrodes_ch02.pdf

La figura 16 muestra un diagrama esquemático de un circuito de Voltage de dos electrodos, El método de dos electrodos son aplicados a fijaciones de neuronas grandes. Dado que para células pequeñas es muy difícil su implementación.

4.3.7 Comportamiento eléctrico.

- **Corriente capacitiva, corriente de fuga y corriente resistiva** Con la técnica de Voltage Clamp si se despolariza la membrana de forma tal que sea 10 mV más despolarizado, se logra observar el comportamiento de la figura 17.

Figura 18. Respuesta iónica de la célula frente a una despolarización de 10mV



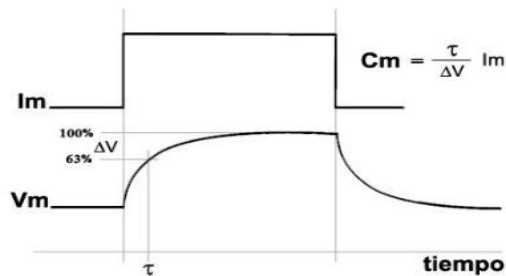
Fuente: RADESCA, Daniel. Inclusión de una célula nerviosa en un circuito electrónico de estimulación y medida. Montevideo: Universidad de la república. Núcleo de ingeniería biomédica. 2009. p. 8

Una pequeña corriente saliente (más positiva) que disminuye sin llegar a cero se mantiene constante mientras se mantenga despolarizada la membrana. Al volver al potencial de membrana original se observa previamente una rápida corriente entrante. Las corrientes entrantes y salientes corresponden a las corrientes capacitivas y a la corriente que se mantiene constante es la corriente de fuga, ésta causada por la permanencia de canales abiertos que permiten el paso de iones.

Si se obliga a la célula a mantenerse despolarizada por encima de su potencial umbral se observa que se distorsiona totalmente la anterior gráfica. Aumenta las corrientes capacitivas y de fuga, a la vez que corrientes entrantes de sodio y corrientes salientes de potasio aparecen debido a canales dependientes de la tensión. Las corrientes a través de estos últimos canales se denominan corrientes resistivas.

- **Cambio del potencial de membrana en respuesta a un pulso de Corriente.** Dado que la resistencia y la capacitancia de la membrana están en paralelo, la tensión a través de cada elemento siempre es el mismo y es igual al potencial de membrana (V_m).

Figura 19. Esquema del comportamiento de membrana frente a un pulso de corriente.



Fuente: RADESCA, Daniel. Inclusión de una célula nerviosa en un circuito electrónico de estimulación y medida. Montevideo: Universidad de la república. Núcleo de ingeniería biomédica, 2009. p. 8

Para conocer la capacitancia de la membrana se necesita realizar un pulso de corriente de intensidad conocida y durante el proceso de carga del capacitor conocer la constante de tiempo de 63% para el voltaje (τ). Aplicando la ley de Ohm para obtener la resistencia, y sabiendo que:

$$R_m = C_m \tau^{39}$$

4.3.8 Nuevos desarrollos e implementaciones del Voltage Clamp. Los amplificadores modernos están equipados con un modo dedicado de fijación de Tensión. El Voltage Clamp es la técnica más precisa para los factores de amplificación grandes en células. Sin embargo, existe una limitación práctica para el factor de amplificación en el sentido de que una amplificación demasiado grande puede conducir a oscilaciones incontroladas, causadas esencialmente por ruido excesivamente amplificado. Estas oscilaciones se conocen como "sonar" y normalmente resultan en la destrucción de la célula que está siendo registrada.

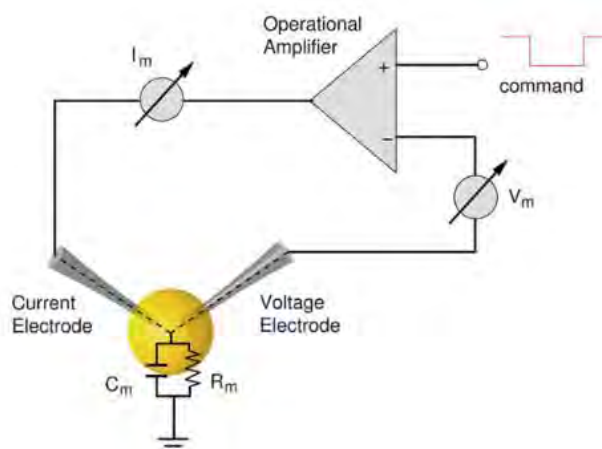
Los métodos modernos Voltage Clamp (Figura 20) utilizan electrodos de vidrio en lugar de cables que permite la grabación de células más pequeñas.⁴⁰ Las pipetas de vidrio tienen puntas muy finas (<1 mm) que pueden crear dificultades en la medición exacta. Primero, son conductores no tan buenos como los alambres usados por Cole y no pueden a veces pasar la corriente lo suficientemente rápido para compensar fuertes corrientes celulares. Esto es particularmente relevante para corrientes rápidas donde tanto la resistencia óhmica del electrodo como su resistencia capacitiva se vuelven problemáticas.

³⁹ RADESCA, Daniel. Inclusión de una célula nerviosa en un circuito electrónico de estimulación y medida. Montevideo: Universidad de la república. Núcleo de ingeniería biomédica, 2009. p.8.

⁴⁰ BOURNE John R., Op. cit. p. 248

Un problema relacionado es que las inyecciones de corriente no pueden controlar el potencial de membrana en toda la superficie celular para las células donde la condición isopotencial no se cumple, al menos en escalas de tiempo rápidas. Este problema llamado "abrazadera espacial" se resolvió en el dispositivo de Cole usando un cable largo que sujetaba el axón del calamar uniformemente a lo largo de toda su longitud, pero es agudo con los electrodos de vidrio. Cuando se utilizan electrodos de vidrio de alta impedancia, la corriente inyectada creará una caída del potencial eléctrico a lo largo del electrodo. Estos artefactos de electrodo pueden ser considerables, y para permitir una pinza de tensión precisa.

Figura 20. Nuevos métodos de Voltage Clamp

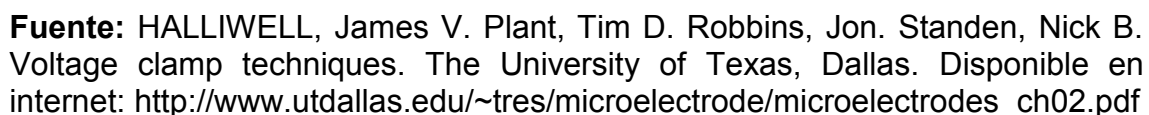


Fuente: DIETER, Jaeger. Ranu, Jung. Encyclopedia of Computational Neuroscience. New York: Springer Science, 2015. p. 1060.

4.3.9 Evolución del Voltage Clamp. Para la grabación y la inyección de corriente se usan a menudo dos electrodos (pinza de tensión de dos electrodos). Sin embargo, la abrazadera de voltaje de dos electrodos es difícil de usar, en particular en células de mamífero más pequeñas, porque penetrar las neuronas con dos electrodos es problemático y puede causar daño a la célula dando lugar a fugas de contenido celular y grandes corrientes de fuga a través de la membrana. Además, en muchas preparaciones, las células son demasiado pequeñas, siendo casi imposible insertarlas con un segundo electrodo. Para superar estos problemas, se han desarrollado una serie de técnicas de Voltage Clamp de un solo electrodo.

4.3.10 Voltage Clamp de un solo electrodo. El Voltage Clamp de un solo electrodo permite grabar desde células pequeñas que sería imposible empalar con dos electrodos. Esta disposición de sujeción de circuitos de propósito especial en la que se utiliza un único microelectrodo no sólo para medir la tensión de membrana, sino también para pasar la corriente necesaria para

Figura 21. Voltage Clamp de un solo electrodo



⁴¹ HALLIWELL, James V. Plant, Tim D. Robbins, Jon. Standen, Nick B. Op. cit. p. 28

4.3.11 Nuevas Propuestas.

4.3.11.1 Abrazadera discontinua de voltaje de un solo electrodo. En la pinza discontinua de tensión de un solo electrodo, la inyección de corriente y la medición del potencial de membrana no se realizan continuamente y simultáneamente como en la pinza de tensión continua. En su lugar, el sistema experimenta un ciclo rápido de alternancia entre corriente de paso y voltaje de medición. El amplificador mide el voltaje en los primeros milisegundos del ciclo de trabajo, genera la señal de error y luego pasa la corriente para recordar el ciclo para reducir ese error

El método se basa en que la capacidad de la célula es significativamente mayor que la capacitancia del electrodo, típicamente en al menos un orden de magnitud, de manera que se eliminan los artefactos de electrodo causados por la desintegración de la inyección de corriente. La frecuencia del ciclo de trabajo debe optimizarse para que coincida con la escala de tiempo del electrodo para minimizar el artefacto restante al medir el potencial de membrana y maximizar la constancia del potencial de membrana. Cuanto menor es la capacidad del electrodo, más corto puede ser el ciclo y mejor será el control de voltaje.

- **Desventajas.** Mientras que el Voltage Clamp discontinuo permite la sujeción de tensión con electrodos de mayor impedancia, tiene una resolución de tiempo limitada y toma más habilidad que una pinza de voltaje continuo. Uno de los problemas prácticos a menudo encontrados, es que el problema de las oscilaciones debido a la ganancia de amplificador es mucho más crítico debido al cambio rápido entre la inyección y la medición que añade ruido considerable.

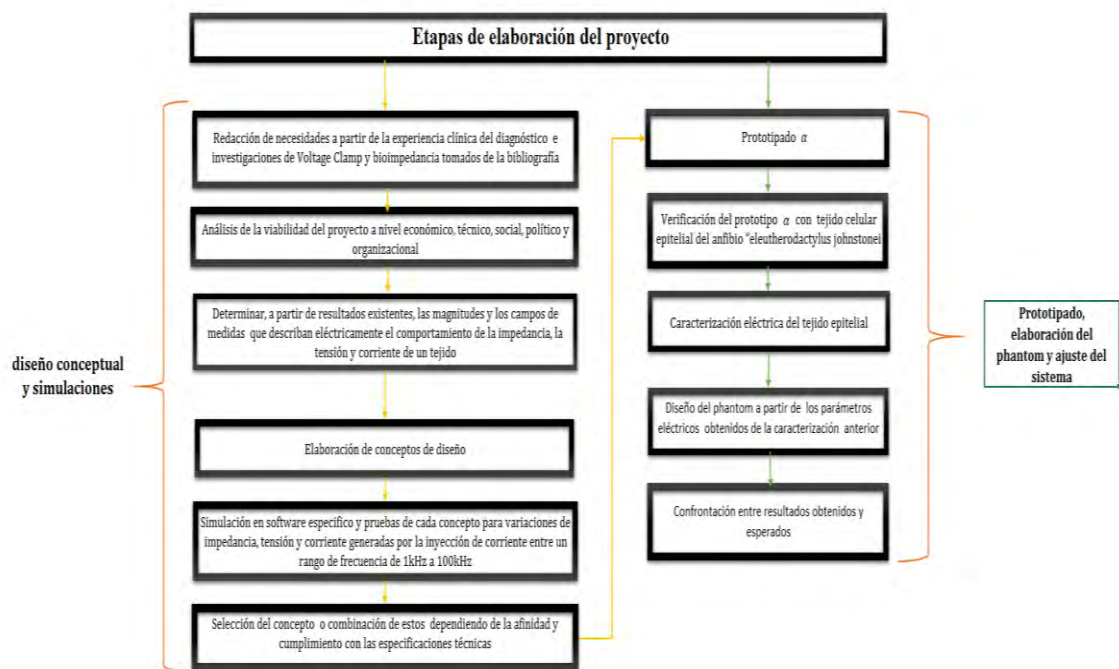
- **Avances tecnológicos.** Con el advenimiento de computadoras más rápidas, los métodos de análisis tradicionales han sido reemplazados por métodos de estimación de parámetros más precisos durante todo el recorrido de la corriente. Algunas extensiones recientes han continuado esta tendencia introduciendo nuevas formas de onda.

Un desarrollo moderno diferente ha sido la compensación activa del electrodo en el 2008 por Brette donde en lugar de usar inyecciones discontinuas de corriente en un Voltage Clamp de un solo electrodo, se usa un ordenador para estimar los artefactos de voltaje en un solo electrodo en tiempo real y los resta digitalmente del potencial de membrana medido. Este nuevo método permite la sujeción continua de un solo electrodo con electrodos de impedancia relativamente alta.

5 METODOLOGÍA DE DISEÑO

En el diseño de dispositivos médicos, es importante involucrar una metodología de desarrollo estructurada que permita generar dispositivos de calidad, para cumplir esta premisa se aplicó la metodología Ulrich para el proceso de desarrollo de proyecto como se puede observar en la siguiente Figura.

Figura 22. Esquema de la metodología de diseño aplicada



Dado que este proyecto es desarrollado para un entorno de investigación el enfoque de la metodología estará basado más en el diseño de una herramienta de investigación más que en un producto industrial.

Se tuvieron en cuenta los siguientes ítems en la metodología:

- Declaración de la misión
- Recopilar e identificar las necesidades
- Especificaciones técnicas

- Generación y selección de conceptos
- Resultado final a desarrollar
- Prototipado

5.1 DECLARACIÓN DE LA MISIÓN

La siguiente tabla muestra la declaración de la misión, documentando la Descripción del dispositivo, los mercados objetivos, las premisas y restricciones.

Tabla 1. Declaración de la misión

Declaración de la misión: diseño e implementación de un sistema de medición in-vitro, basado en las técnicas de Voltage Clamp y Bioimpedancia.	
Descripción del dispositivo	Dispositivo eléctrico que permita sensar el tránsito de sodio utilizando la técnica de bioimpedancia
Mercado primario	Investigadores interesados en el área de medición de variables bioeléctricas
Premisas y restricciones	<p>Permite replicar las mediciones de impedancia en tejido de los métodos convencionales a demás sensar el tránsito de corriente de sodio.</p> <p>Por ser el primer prototipo es un diseño robusto no portable, utilizable sólo a nivel de laboratorio.</p> <p>Necesita de fuente de alimentación.</p>

5.2 IDENTIFICACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LAS NECESIDADES

La identificación e interpretación de las necesidades es una parte integral del proceso de desarrollo, ya que las necesidades se utilizan para guiar las fases siguientes del diseño. La identificación de necesidades se realizó mediante la recopilación de información de múltiples fuentes bibliográficas dedicadas al estudio de mediciones de parámetros electrofisiológicos basados en las técnicas de bioimpedancia y Voltage Clamp.

Tabla 2. Identificación e interpretación de las necesidades

Identificación e interpretación de las necesidades	Importancia
Replica valores de impedancia obtenidas con las técnicas convencionales	5
Permite sensor el tránsito de corrientes de sodio	5
Fácil de controlar	3
Los datos obtenidos del sistema de medición son claros y fáciles de entender	4
Permite almacenar datos	3
Analizar tanto Phantoms como Tejidos	4
Disminuye y/o elimina los artefactos eléctricos	3
Rango de trabajo en región de relajación β	5
Confiabilidad de Datos	5

5.3 ESPECIFICACIONES TÉCNICAS

Las necesidades por lo general se expresan en un lenguaje coloquial, por lo cual proporcionan una guía específica escasa sobre como diseñar y crear un dispositivo mediante la ingeniería, y se deja mucho margen para la interpretación subjetiva, por tanto hay la necesidad de traducir las necesidades a un lenguaje de ingeniería, es decir, un lenguaje medible, que aporte con detalle preciso lo que el producto tiene que hacer, en este caso representado en la Tabla 3.

Tabla 3. Especificaciones técnicas

Métrica	Importancia	Descripción
Rango de Tensión (mV)	5	El rango de tensión que el dispositivo leerá es de 0-200mV
Intensidad de Corriente (mA)	5	La corriente inyectada tiene como valor máximo permitido 30 mA
Rango de Frecuencia (Hz-kHz)	5	El rango de la señal de entrada oscilará entre 1kHz a 100kHz
Interfaz gráfico	3	Los parámetros mínimos a visualizar son la magnitud y fase de la impedancia
Adquisición de Datos	4	Los datos necesarios para la medición son la corriente y la tensión en el phantom y/o tejido
Sistema de inyección de soluciones y cámara de tejidos	4	Sistema que permita la correcta ubicación del tejido mientras se inyecta corriente y se capta tensión
Acondicionamiento de la señal	4	Disminución de los diferentes tipos de ruido
Método de medición		Para detallar los diferentes métodos de medición dirigirse al apartado de métodos de medición del Voltage Clamp y la bioimpedancia
Repetitividad	5	Para diferentes medidas bajo los mismos estándares los resultados tendrán una variabilidad no mayor al 10%
Exactitud	5	Los datos medidos deben tener las magnitudes coherentes con el estudio

5.4 RELACIÓN ENTRE MÉTRICAS Y NECESIDADES

Puesto que las métricas pueden cubrir diversas necesidades es necesario realizar una relación entre ellas y poder distinguir sus afinidades, influyendo en el grado en que el producto satisface la necesidad, de acuerdo a esto, la tabla 4 muestra la relación entre métricas y necesidades.

Tabla 4. Relación entre especificaciones técnicas y necesidades

	Importancia	Rango de Tensión (mV)	Intensidad de Corriente (mA)	Rango de Frecuencia (Hz-kHz)	Interfaz gráfico	Adquisición de Datos	Sistema de inyección de soluciones y cámara de tejidos	Acondicionamiento de la señal	Metodo de medición	Repetitividad	Exactitud
Replica valores de impedancia obtenidas con las técnicas convencionales	5	*	*	*						*	*
Permite sensor el tránsito de corrientes de sodio	5	*	*	*							*
Fácil de controlar	3								*		
Los datos obtenidos del sistema de medición son claros y fáciles de entender	4				*	*		*			
Permite almacenar datos	3					*					
Analizar tanto Phantoms como Tejidos	4						*		*		
Disminuye y/o elimina los artefactos eléctricos	3							*	*		
Rango de trabajo en región de relajación β	5			*					*		
Confiabilidad de Datos	5									*	*

5.5 GENERACIÓN DE CONCEPTOS

A continuación se mostrara una descripción de la tecnología y principio de funcionamiento, partiendo de un conjunto de necesidades y especificaciones objetivo, y dando como resultado un conjunto de conceptos de los cuales se realizará una selección.

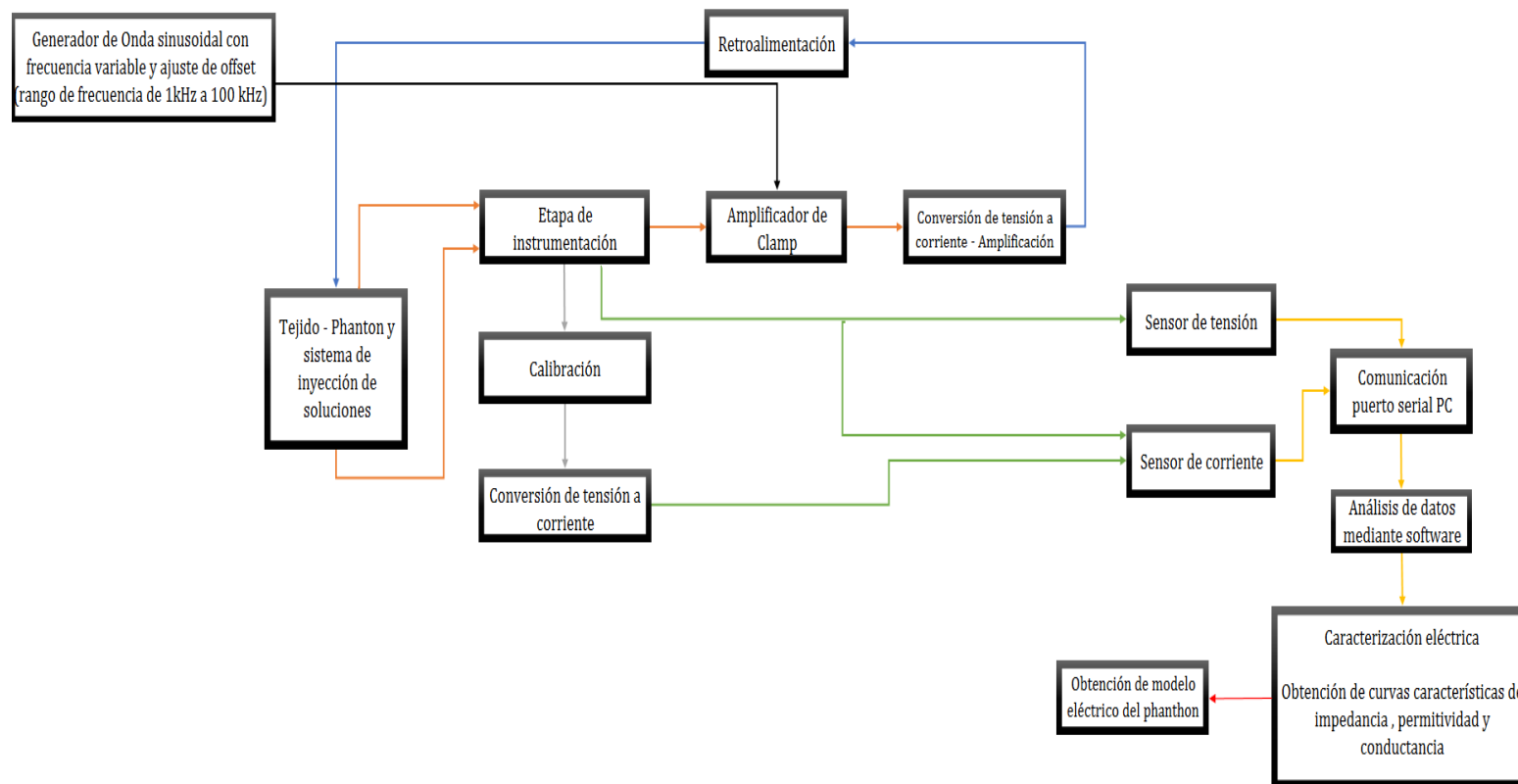
5.5.1 Descomposición funcional: En el siguiente diagrama se mostraran las secciones funcionales para crear una descripción más específica de lo que deberían hacer el sistema de medición e implementar su función global. Las secciones funcionales que compone el medidor de impedancia eléctrica son:

- Generador de onda sinusoidal con frecuencia variable y ajuste de offset (frecuencia de trabajo 1 kHz a 100 kHz).
- Tejido – Phantom y sistema de inyección de soluciones.
- Voltage Clamp.
- Conversión de tensión a corriente – amplificación

- Sensores de tensión y corriente.
- Análisis por software.
- Diseño de Phantom

El objetivo de la Figura 23 es describir los elementos funcionales del sistema de medición sin implicar un principio tecnológico específico para el concepto.

Figura 23. Diagrama funcional del sistema de medición.



5.5.2 Tecnología: La tecnología que se empleara para el diseño está directamente relacionada con el cumplimiento de las necesidades y especificaciones técnicas por tal motivo a continuación se describirán los elementos tanto de hardware como de software necesarios para el desarrollo de los conceptos y así tener una idea más clara de que componentes son los idóneos para el desarrollo del sistema de medición.

5.5.2.1 Microcontrolador. El microcontrolador es el dispositivo programable que se empleara para leer la señal de tensión medida y producir la señal que se inyectara en el tejido y/o phantom, a continuación se mostrara los tres microcontroladores que se sometieron a estudio con su respectiva ficha técnica.

Figura 24. Características técnicas del Arduino Uno

Microcontroller	ATmega328P
Operating Voltage	5V
Input Voltage (recommended)	7-12V
Input Voltage (limit)	6-20V
Digital I/O Pins	14 (of which 6 provide PWM output)
PWM Digital I/O Pins	6
Analog Input Pins	6
DC Current per I/O Pin	20 mA
DC Current for 3.3V Pin	50 mA
Flash Memory	32 KB (ATmega328P) of which 0.5 KB used by bootloader
SRAM	2 KB (ATmega328P)
EEPROM	1 KB (ATmega328P)
Clock Speed	16 MHz
LED_BUILTIN	13
Length	68.6 mm
Width	53.4 mm
Weight	25 g

Fuente: Arduino Uno [en línea] Arduino. Disponible en: <https://www.arduino.cc/en/Main/ArduinoBoardUno>.

Figura 25. Características técnicas del Arduino Due.

Microcontroller	ATmega1280
Operating Voltage	5V
Input Voltage (recommended)	7-12V
Input Voltage (limits)	6-20V
Digital I/O Pins	54 (of which 15 provide PWM output)
Analog Input Pins	16
DC Current per I/O Pin	40 mA
DC Current for 3.3V Pin	50 mA
Flash Memory	128 KB of which 4 KB used by bootloader
SRAM	8 KB
EEPROM	4 KB
Clock Speed	16 MHz

Fuente: Arduino Mega [en línea] Arduino. Disponible en: <https://www.arduino.cc/en/Main/arduinoBoardMega>.

Figura 26. Características técnicas del Arduino Due.

Technical specs

AVR Arduino microcontroller

Microcontroller	AT91SAM3X8E
Operating Voltage	3.3V
Input Voltage (recommended)	7-12V
Input Voltage (limits)	6-16V
Digital I/O Pins	54 (of which 12 provide PWM output)
Analog Input Pins	12
Analog Output Pins	2 (DAC)
Total DC Output Current on all I/O lines	130 mA
DC Current for 3.3V Pin	800 mA
DC Current for 5V Pin	800 mA
Flash Memory	512 KB all available for the user applications
SRAM	96 KB (two banks: 64KB and 32KB)
Clock Speed	84 MHz
Length	101.52 mm
Width	53.3 mm
Weight	36 g

Fuente: Arduino Due [en línea] Arduino. Disponible en: <https://www.arduino.cc/en/Main/ArduinoBoardDue>.

5.5.2.2 Conversión de tensión a corriente y amplificación. Para poder medir los cambios dieléctricos en el tejido y/phantom es necesaria la inyección de una corriente con una amplitud determinada, la etapa de conversión de tensión a corriente y amplificación permite transformar la tensión en corriente y mediante

la amplificación se establecerá la amplitud requerida, a continuación se mostraran los encapsulados utilizados en las propuestas para esta etapa.

- **LF356 Amplificadores Operacionales de entrada JFET:**

- **Descripción general:** Amplificador operacional con ancho de banda de 5 MHz, alta velocidad, entradas de alta impedancia JFET, bajo ruido, tiempo de establecimiento extremadamente corto, offset ajustable, puede manejar cargas capacitivas grandes

Tabla 5. Ventajas, características y aplicaciones del LF356

VENTAJAS	CARACTERÍSTICAS COMUNES	APLICACIONES
Reemplaza costosos híbridos y módulos de amplificadores FET	Bajo consumo de potencia	Integradores de alta velocidad de precisión
Compensación interna y una alta tensión de entrada diferencial	Ancho de banda típico: 5 MHz	Conversores ADC y DAC rápidos
Excelente para aplicaciones de bajo ruido utilizando ya sea alta o baja impedancia de fuente	Tiempo de establecimiento al 0.01% extremadamente corto: 1.5 μ	Buffer de alta impedancia
Ajustable sin degradar el drift y el rechazo en modo común	Entradas a JFET con impedancias de entrada alta: 1 T Ω	Circuitos de muestreo y retención (Sample and hold)
Puede manejar cargas capacitivas de hasta 5000 pF sin problemas de estabilidad	Corriente de entrada de polarización baja: 30 pA	Amplificadores logarítmicos
	Corriente de entrada offset baja: 3 pA Voltaje offset de entrada: 3 mV típico	Amplificadores de fotocélulas

Fuente: NATINAL SEMICONDUCTOR [en línea] JFET Input Operational Amplifiers LF356. Disponible en:
<http://pdf.datasheetcatalog.com/datasheet/nationalsemiconductor/LF356.pdf>

- **AD629 amplificador diferencial de Alta tensión modo común.**

- **Descripción general.** El AD629 es un amplificador diferencial que permite medir con precisión señales diferenciales en presencia de tensiones altas, modo común de hasta ± 270 V. El AD629 puede reemplazar amplificadores de

aislamiento costosos en aplicaciones que no requieren aislamiento galvánico. El dispositivo opera sobre un rango de tensión de modo común ± 270 V y tiene entradas que están protegidas de modo común o en modo diferencial transitorios de hasta ± 500 V. Se caracteriza por tener una compensación de offset bajo, baja deriva error de ganancia, baja deriva el rechazo de modo común, y excelente CMRR a lo largo de un amplio rango de frecuencias.

Tabla 6. Ventajas, características y aplicaciones del AD629

Características	ALTO RENDIMIENTO PRECISIÓN DC	ESPECIFICACIONES AC EXCELENTES
Reemplazo mejorado para: INA117P y INA117KU \pm rango de voltaje de modo común de 270 V	3 ppm de ganancia máxima linealidad (AD629B)	77 dB mínimo CMRR @ 500 Hz (AD629A)
Protección de la entrada de: \pm modo común 500 V \pm modo diferencial 500 V	20 mV / $^{\circ}$ C deriva desplazamiento máximo (AD629A)	86 dB mínimo CMRR @ 500Hz (AD629B)
Gama amplia de fuente de alimentación ($\pm 2,5$ V a ± 18 V ± 10 V oscilación de salida de ± 12 V de alimentación)	10 mV / $^{\circ}$ C como máximo la deriva offset (AD629B)	Ancho de banda de 500 kHz
Corriente máxima fuente de alimentación 1 mA	10 ppm / $^{\circ}$ C máxima ganancia de la deriva	
APLICACIONES		
Detección de corriente de alto voltaje		
Monitores de tensión pilas		
Controles de motores		

Fuente: High Common-Mode Voltage, Difference Amplifier AD629 [en línea] Analog Devices [Consultado 15 Enero 2016] Disponible en: <http://www.analog.com/media/en/technical-documentation/data-sheets/AD629.pdf>

- **AD8016 Amplificador de baja potencia, alto rendimiento conductor actual VDSL Línea.**

- **Descripción general.** El AD8016 es un controlador de línea DSL de 2ª generación capaz de entregar la velocidad máxima ADSL desde la red telefónica requiriendo solo 1,5 W de disipación de potencia total, opera desde \pm

12 V de alimentación, y realiza un proceso bipolar de alta velocidad que permite a cada AD8016 del encapsulado suministrar tensión de salida de 20 V-pk-pk y una corriente de salida típica de más de 400 mA.

Tabla 7. Ventajas y características del AD8016

Driver de línea xDSL que cuenta con oficina central completa ADSL (CO)	Alta tensión de salida y current drive IOUT = 600 mA 40 V p-p differential output voltage RL = 50Ω, VS = ±12 V
El rendimiento en ± 12 V suministros	Baja distorsión de un solo tono 75 dBc @ 1 MHz SFDR, RL = 100 Ω, VOUT = 2 V p-p MTPR = -75 dBc, 26 kHz to 1.1 MHz, ZLINE = 100 Ω, PLINE = 20.4 dBm
Funcionamiento de baja tensión: ± 5 V a ± 12 V de tensión de alimentación 12,5 mA / A de corriente en la oferta total (típico)	Alta velocidad: 78 MHz de ancho de banda (-3 dB), G = 5 1000 V /us velocidad de subida

Fuente: Low Power, High Output Current xDSL Line Driver AD8016[en línea] Analog Devices[consultado 15 Enero 2016] Disponible en: <http://www.analog.com/media/en/technical-documentation/data-sheets/AD8016.pdf>

5.5.3 Configuraciones para el conversor de tensión a corriente y amplificación. En las siguientes configuraciones se emplearan los componentes mencionados anteriormente los cuales cumplirán las siguientes funciones:

LF356 - Configurado a conversor de tensión a corriente convencional

AD629 - Conversor de tensión a corriente

AD8016 - Amplificador de corriente

Figura 27. Conversión de tensión a corriente convencional – Amplificador AD8016

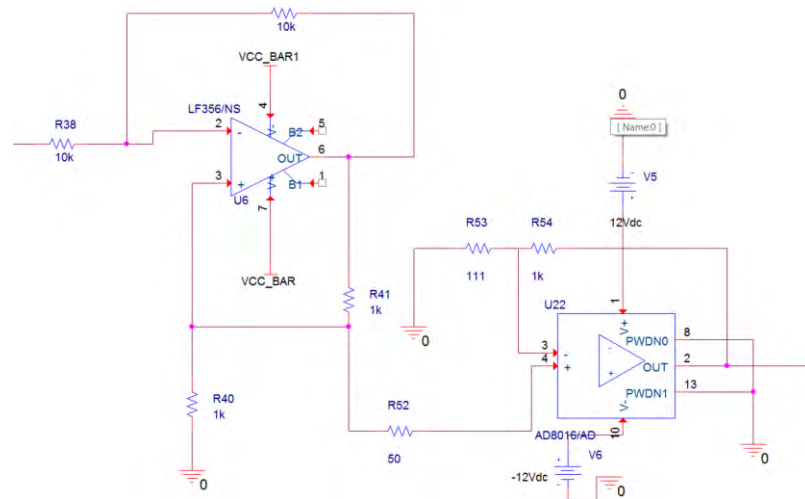


Figura 28. AD629 – AD8016

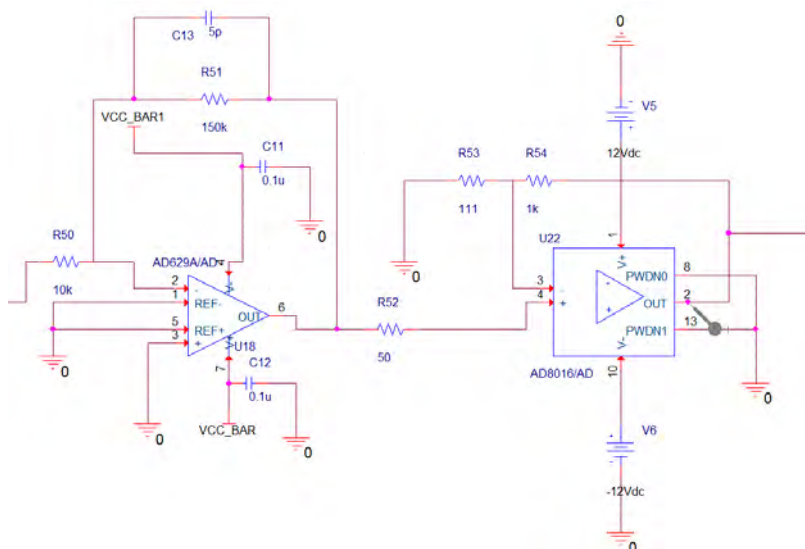


Figura 29. Conversor de tensión a corriente convencional sin amplificación

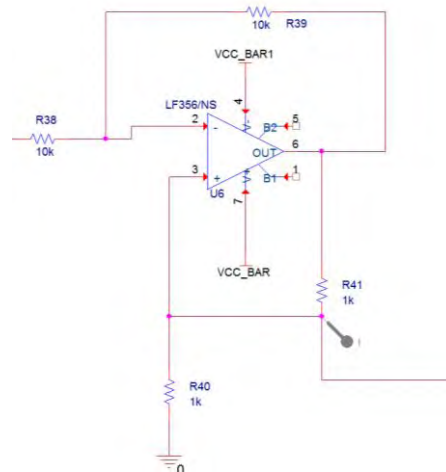
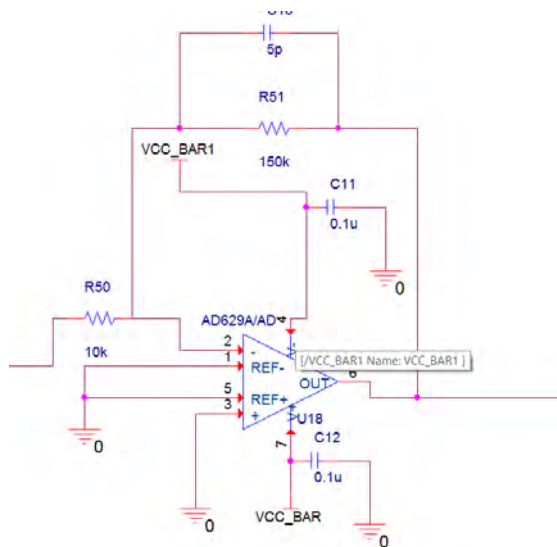


Figura 30. AD629 sin amplificación



5.6 CONCEPTOS DE DISEÑO

En la siguiente tabla se mostrarán 4 ideas de conceptos con sus respectivas partes funcionales.

Tabla 8. Conceptos de diseño

Partes funcionales del sistema de medición							
Conceptos	Generador de Onda con frecuencia variable (Microcontrolador)	Tejido - phantom y sistema de inyecciones solución	Sistema de Clamp			Sensor de corriente - Sensor de tensión	Interfaz grafico -análisis Matemático
			Método de Medición	Convertor de tensión a corriente	Aplicación		
A	Arduino Uno	Cámara Ussing	Dos electrodos	AD629	AD8016	Arduino Uno	Matlab
B	Arduino Mega	Cámara Ussing	Dos electrodos	Convertor de tensión a corriente convencional	AD8016	Arduino Mega	Matlab
C	Atmel SAM3X8E ARM Cortex-M3 CPU	Cámara Ussing	Tres electrodos	Convertor de tensión a corriente convencional	AD8016	Atmel SAM3X8E ARM Cortex-M3 CPU	Matlab
D	Atmel SAM3X8E ARM Cortex-M3 CPU	Cámara Ussing	Tres electrodos	AD629	AD8016	Atmel SAM3X8E ARM Cortex-M3 CPU	Matlab - Origin

5.7 SELECCIÓN DE CONCEPTOS

En esta fase se evalúan los conceptos con respecto a las necesidades, así como otros criterios, comparando las fortalezas y debilidades de los conceptos, y seleccionando uno para investigación, prueba y desarrollo adicional. Se emplea el tamizaje de conceptos para seleccionar cuáles conceptos continúan a la siguiente fase y/o cuáles se pueden combinar.

5.7.1 Matriz para el tamizaje de conceptos. En la Tabla 9 se muestra las entradas (conceptos y criterios) de la matriz y la puntuación relativa “mejor que” (+), “igual a” (0) o “peor que” (-) para representar cómo cada concepto califica en comparación con el concepto de referencia respecto al criterio en particular.

Tabla 9. Matriz de tamizaje

Criterios de selección	A	B	C	D	Ref.
Generación de onda entre 1kHz - 100kHz	-	-	+	+	0
Muestreo de Señal entre 1kHz - 100kHz	0	0	+	+	0
Señal AC con la suficiente amplitud	+	+	+	+	0
Interfaz Grafico	0	0	0	+	0
Detección de parámetro eléctricos en la región de relajación B	0	0	+	+	
Unidad de control	+	+	+	+	
Total	1	1	5	6	
Continua ?	NO	NO	SI	SI	

5.7.2 Matriz para evaluar conceptos. En la Tabla 10 se muestra los conceptos seleccionados y evaluados entre ellos con respecto a una referencia, para así encontrar el concepto definitivo; utilizando una escala más precisa:

Uno: Mucho peor que...

Dos: Peor que...

Tres: Igual a...

Cuatro: Mejor que

Cinco: Mucho mejor que

Tabla 10. Matriz para evaluar conceptos

	Referencia	C		D	
Criterios de selección	Ponderación	Nota	Criterio ponderado	Nota	Criterio
Generación de onda entre 1kHz - 100kHz	20	5	1	5	1
Muestreo de Señal entre 1kHz - 100kHz	20	5	1	5	1
Señal AC con la suficiente amplitud	20	4	0,8	5	1
Interfaz Grafico	10	3	0,3	3	0,3
Detección de parámetro eléctricos en la región de relajación B	20	5	1	5	1
Unidad de control	10	4	0,4	5	0,5
	Total		4,5		4,8
	Continúa				Desarrollar

5.8 ARQUITECTURA

El propósito de la arquitectura es definir los bloques constructivos físicos del producto en términos de lo que hacen, y de cuáles son sus interfaces para el resto del dispositivo.

5.8.1 Diagrama esquemático. En el diagrama esquemático de la Figura 31 se muestra todos los flujos existentes sistema de medición además de la agrupación de similitud de funciones que cumple cada uno de los componentes.

Generador de señal: el microcontrolador Atmel SAM3X8E ARM Cortex-M3 CPU es el encargado de generar la señal con una frecuencia variable de 1kHz a 100kHz.

Tejido - Phantom y sistema de inyección de soluciones: se utilizará una cámara ussing como soporte para el tejido de estudio, esta camera estará configurada bajo el método de 3 Electrodo.

Sistema de Clamp: esta comprende todo el Voltage Clamp desde la parte de captación de tensión, conversión a corriente de sodio, calibración y acondicionamiento de la señal.

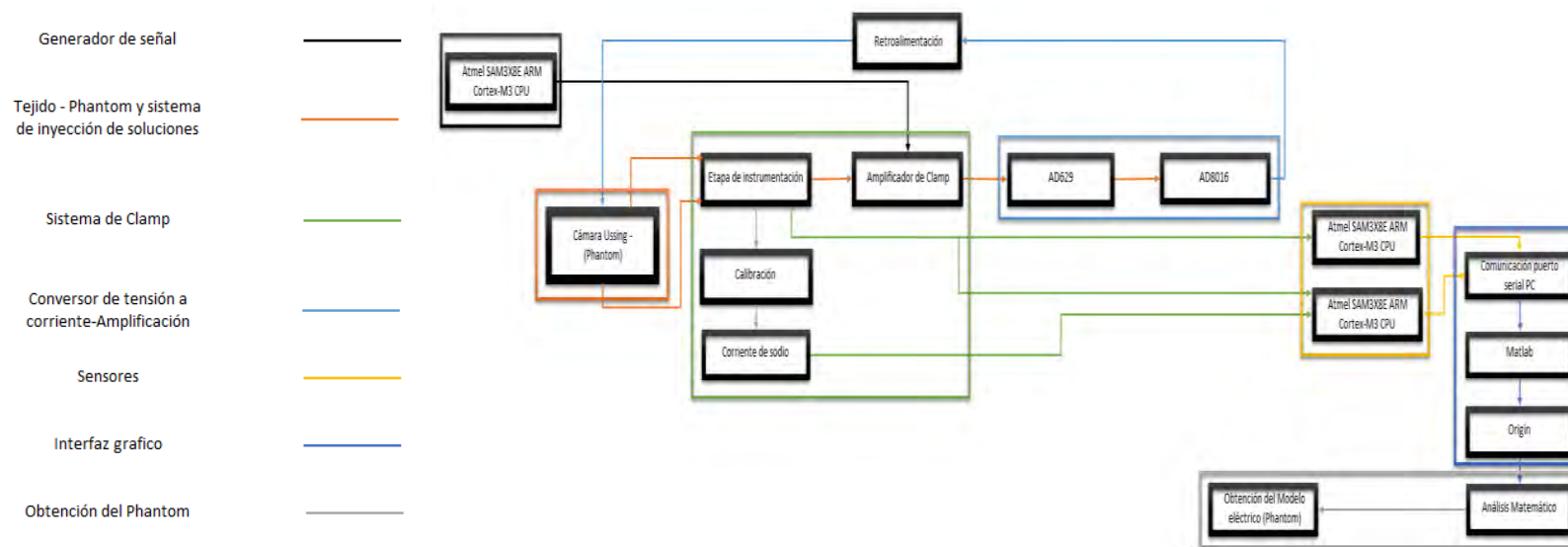
Conversor de tensión a corriente y amplificación: como conversor de tensión a corriente se empleara el integrado AD629 y como amplificación de corriente el AD8016.

Sensores: como sensores de tensión y de corriente se utilizaran dos Atmel SAM3X8E ARM Cortex-M3 CPU uno para cada magnitud (la detección corriente se realizara matemáticamente con la herramienta Matlab).

Interfaz Gráfica: posterior a la adquisición de datos estos serán pasado por comunicación serial Matlab donde mostrando las Grafica de magnitud y fase de la impedancia y apoyándose con el software Origin se analizarán los demás fenómenos eléctricos.

Obtención del phantom: con los datos obtenidos de Matlab y Origin se realizará un análisis matemático que permitirá el diseño de un Phantom que simule el comportamiento del tejido estudiado.

Figura 31. Diagrama esquemático

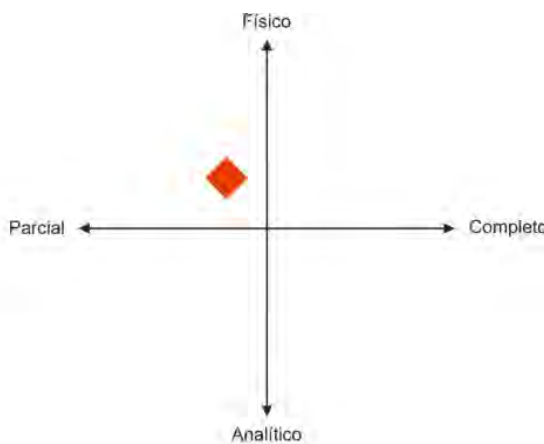


5.9 PROTOTIPADO

Propósito: El prototipo se crea con fines de aprendizaje, es decir, para comprobar si funcionará y cumplirá con los requerimientos del usuario y a qué nivel lo hará.

- **Grado de aproximación:** Se utilizará una aproximación física con el fin de comprobar lo modelado en el prototipo analítico

Figura 32. Tipo de prototipo



Fuente: Karl Ulrich. Metodología de desarrollo de productos. p. 180

- **Plan Experimental:** Las variables utilizadas en el prototipo son: *la amplitud, la frecuencia, tensión, la intensidad de corriente*, Magnitud y fase de la impedancia, conductancia.

El protocolo de pruebas a ejecutar es el siguiente:

- Comprobar con un osciloscopio que los valores programados son los Adecuados
- Medición de tensión y corriente en Phantom patrón con el fin de ajustar el sistema de medición a las magnitudes establecidas
- Medición de parámetros electrofisiológicos en tejido epitelial

- Medición de parámetros eléctricos en nuevo phantom diseñado con los datos obtenidos en las mediciones de tejido epitelial.

Se propone llegar al desarrollo de un prototipo alfa ya que se tiene como prioridad asegurar que los parámetros medidos se aproximen a los valores objetivos previamente establecidos.

6 DISEÑO DEL SISTEMA DE MEDICION

Con el fin de obtener el sistema de medición in-vitro que permita registrar la corriente de sodio en epitelios utilizando la técnica de bioimpedancia, se desarrolló el siguiente sistema cuyas premisas de diseño tiene como prioridad la detección de variable electrofisiológicas en tejidos, mediante la medición de tensión y corriente basado en los métodos de Voltage Clamp y bioimpedancia adaptados al método de medición de tres electrodos.

De acuerdo a estas premisas y a la revisión teórica y experimental obtenida, se tendrá en cuenta los siguientes parámetros para el diseño del dispositivo.

- Generador de onda sinusoidal con frecuencia variable y ajuste de offset (frecuencia de trabajo 1 kHz a 100 kHz).
- Cámara Ussing adaptada al método de tres electrodos.
- Sistema de Clamp.
- Sensores de tensión y corriente.
- Interfaz gráfico.
- Diseño de Phantom.

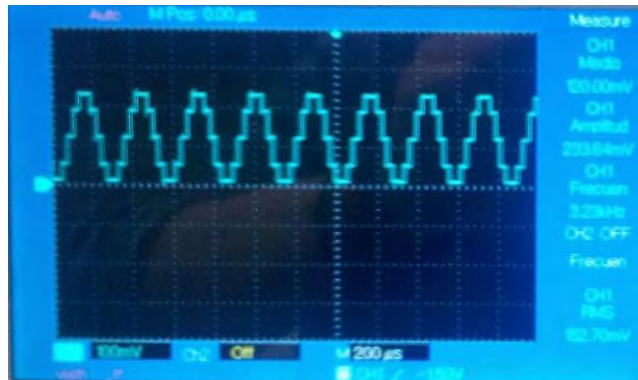
6.1 GENERADOR DE ONDA SINUSOIDAL CON FRECUENCIA VARIABLE Y AJUSTE DE OFFSET (FRECUENCIA DE TRABAJO 1 KHZ A 100 KHZ).

El generador de funciones se diseñó utilizando el microcontrolador Atmel SAM3X8E ARM Cortex-M3 CPU que utiliza el Arduino due, gracias a su reloj 84 MHz y poseer tanto DAC como ADC facilito la implementación del generador; sin embargo el software por default que utiliza la plataforma Arduino tiene instrucciones demasiado lentas, por tal razón fue necesario la programación en lengua.

6.1.1 Generación de la onda. En la estructura de la programación se emplearon dos Timer y el DAC, uno de los Timer se emplea para seleccionar cada cuanto tiempo va a cambiar la frecuencia de la onda sinusoidal (en este caso cada 1.5 s), el otro Timer se utiliza para establecer la frecuencia de la onda seno la cual va de 1kHz a 100 kHz en pasos de 5 kHz y finalmente los

datos de la onda serán enviados al DAC el cual construirá la onda sinusoidal de frecuencia variable. Para ver el código fuente dirigirse al anexo uno.

Figura 33. Onda generada por el Arduino

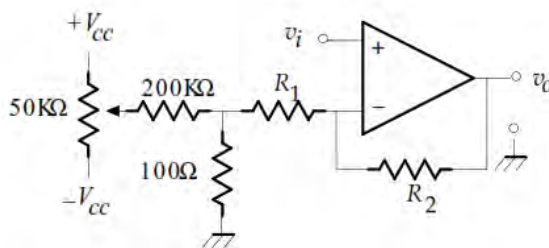


La señal de salida del DAC del Atmel incluye un offset de 1 V este nivel de DC necesita ser ajustado para que la salida de tensión de nuestro sistema de medición no se vea afectada, por esto se recurrió a las técnicas de calibración de offset con operacionales.

6.1.2 Ajuste de offset. Existen múltiples técnicas para la compensación de offset en amplificadores operacionales para este proyecto se empleó la configuración no inversora.

Como se puede observar en la Figura 34. En el terminal inversor a través de R_1 está conectada una malla compensadora.

Figura 34. Malla de compensación para amplificador no inversor



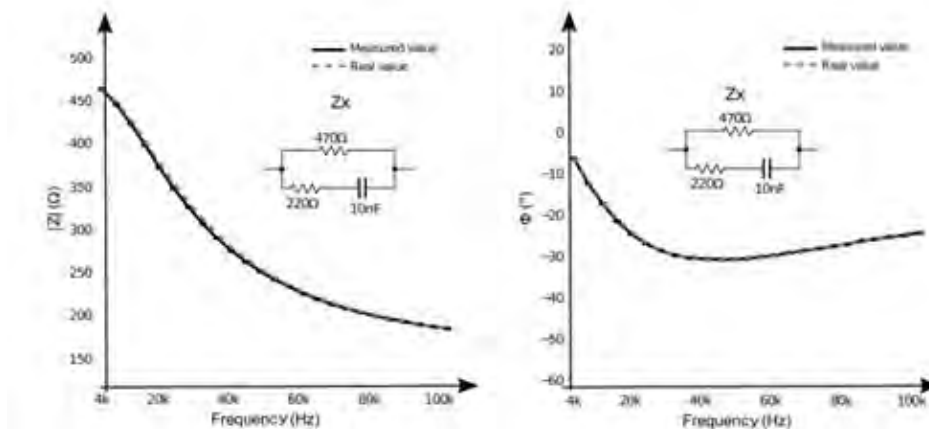
Ecuación de la malla

$$V_{out} = \left(\frac{R_2}{R_1} + 1\right) V_{in} \pm \frac{(200 \text{ k}\Omega \parallel 100 \text{ }\Omega)}{200 \text{ k}\Omega} \left(-\frac{R_2}{R_1 + 200 \text{ k}\Omega \parallel 100 \Omega}\right) V_{cc} \quad (17)$$

6.2 CÁMARA USSING ADAPTADA AL MÉTODO DE TRES ELECTRODOS.

6.2.1 Phantom patron. Los ensayos preliminares se realizaron a partir de un phantom patrón tomado del artículo: Four electrode embedded bioimpedance measurement system, para tener como guía un comportamiento eléctrico conocido y así poder ajustar las magnitudes del sistema de medición.

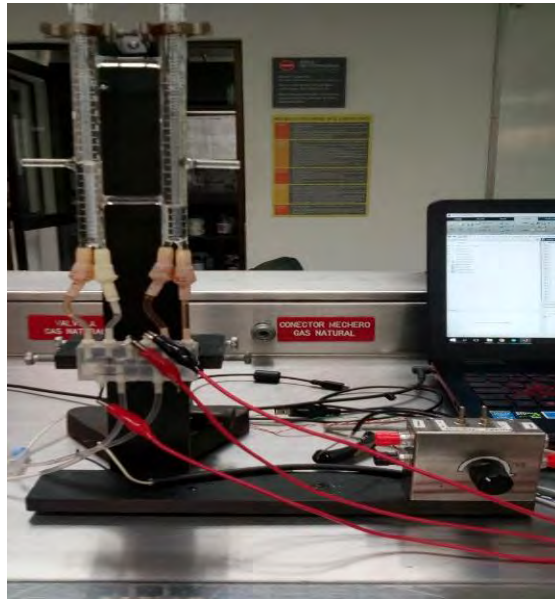
Figura 35. Phantom con su respectivo comportamiento de Amplitud y fase.



Fuente: Cedric Margo, Juliano Katrib, Mustapha Nadi. Four electrode embedded bioimpedance measurement system. Base de datos IEEE publicado el en 2013. p 3

6.2.2 Cámara Ussing adaptada al método de tres electrodos. La cámara Ussing (Figura 36) se utilizó para soporte del tejido y para permitir la inyección de soluciones, este fue facilitado por la Universidad del Valle mediante el profesor Paulo Cesar Calvo, estudiante de Doctorado de dicha Universidad, la cámara fue adaptada para emplear el método de tres electrodos, Disponiendo dos electrodos para la medición de tensión y uno para la inyección de corriente.

Figura 36. Camara Ussing



6.2.3 Electrodo de medida. Se seleccionó el método de tres electrodos porque minimiza los errores de medición, sin embargo, las impedancias parásitas (la impedancia de los cables coaxiales y la impedancia de entrada de los dispositivos) combinadas con la impedancia de la interfaz electrodo-electrolito causan errores a altas y bajas frecuencias.

A continuación, se presentan las consideraciones de diseño y características de electrodos de medición de bioimpedancia que se adoptaron.

- **Consideraciones en el diseño geométrico de los electrodos**
- **Distancia entre los electrodos**
- **Minimizar separación entre electrodos:** La relación entre la caída de tensión (V), la corriente inyectada (I), la resistividad de la muestra (ρ) y la separación constante entre electrodos (r), en un medio uniforme e isotrópico está dada por:

$$V = k \frac{\rho}{r} I \quad (18)$$

Donde k es $4\pi^{-1}$ en el caso de un medio infinito; y $(2\pi^{-1})$ en el caso de un medio semi-infinito (el electrodo es aplicado en un plano superficial de un medio que es encerrado por otro medio con resistividad infinita como es el aire).

Mejorar la resolución espacial: Robillard y Poussart Ivorra (2005) determinaron que la medida de impedancia no está alterada por la transición de medios a distancias más allá de $3 \cdot \text{IESD}$ (*Inter-electrode separation distance*).

- **Evitar o minimizar errores causados por la no-uniformidad del tejido biológico:** Se recomienda para tener un IESD bastante grande para un máximo tamaño celular de la muestra menor que 0.2 mm.

El error inducido en la medida (debido a la interfaz electrodo-electrolito) puede ser minimizado si la impedancia entre electrodos es reducida (especialmente para la corriente colectada en los electrodos) y las impedancias entre los electrodos (donde es medida la caída de tensión) llegan a ser bien acopladas. Por consiguiente, una línea guía de diseño deriva para estos tres factores:

- Utilizar electrodos tan grandes como sea posible.
- Usar la misma geometría entre los electrodos.
- Usar materiales y procesos para obtener electrodos con una Impedancia de interfaz electrodo-electrolito tan pequeña como sea posible.

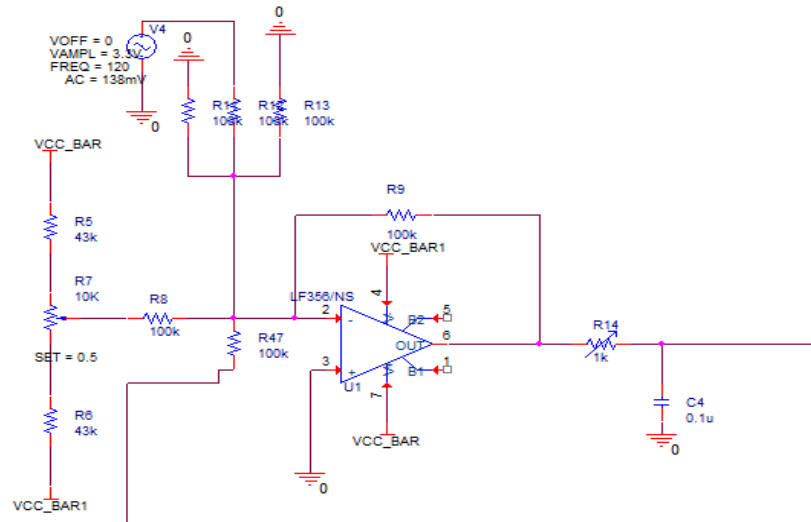
Los tres electrodos empleados son Ag/AgCl, donde dos se conectan en las entradas diferenciales de la etapa de amplificación, y el otro es el que se emplea para inyectar corriente al phantom y/o tejido. Los electrodos son blindados envolviéndolos con papel aluminio entre 1-2 mm de la punta, y luego aislando con un recubrimiento de papel aluminio con vaselina. El blindaje (protección) reduce el acoplamiento de capacidad entre corriente y voltaje de electrodos, ya que provee compensación de capacidad del preamplificador, también incrementa la velocidad de la grabación de voltaje.

6.3 SISTEMA DE CLAMP

Este sistema es compuesto por las siguientes etapas:

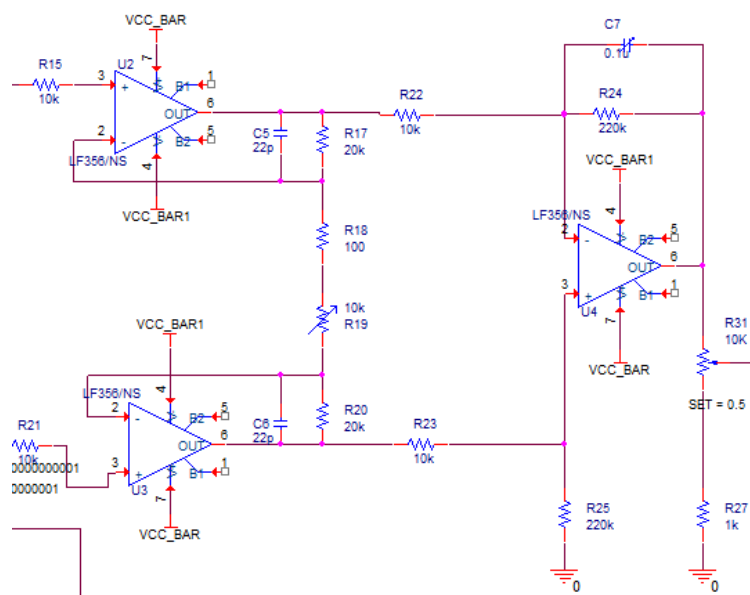
6.3.1 Amplificador sumador. La onda sinusoidal de frecuencia variable pasa a través de un amplificador sumador y luego a través de un filtro variable de pasa-bajo para poder ajustar el tiempo de subida.

Figura 37.configuración de pre procesamiento de la señal



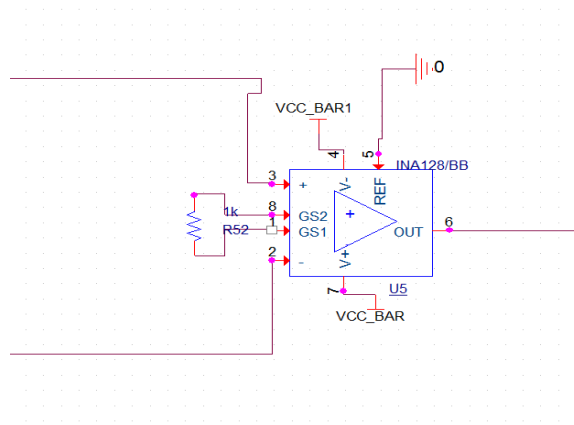
6.3.2 Configuración de amplificador diferencial Esta etapa está basada en una configuración convencional de amplificación diferencial con operacionales LF356 (U2, U3, U4), esta permite calcular la relación entre entrada y salida y así obtener la señal correspondiente al el cambio de potencial en la membrana celular o en el phantom

Figura 38.Configuración diferencial



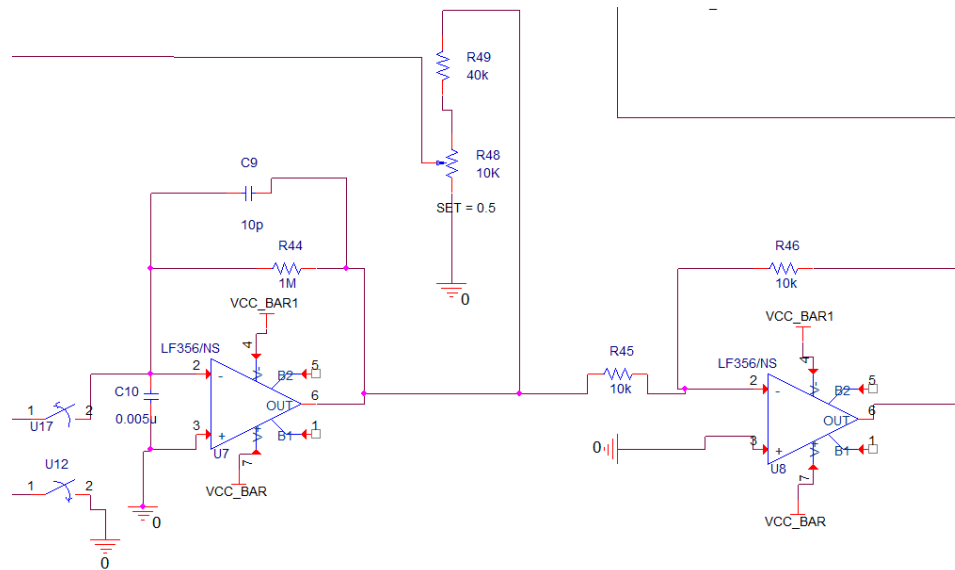
6.3.3 Etapa de Instrumentación. El amplificador U5 es un amplificador de instrumentación el cual es usado para captar la tensión de la membrana celular del tejido o del phantom. La diferencia de potencial es amplificada en un factor de 50. Las entradas inversora y no inversora del amplificador son conectadas a los electrodos de la cámara ussing (pin positivo – región intracelular, pin negativo – región extracelular).

Figura 39.configuración de la etapa de instrumentación



6.3.4 Conversión de tensión a su equivalente en corriente de sodio. La corriente que atraviesa la membrana del tejido o el phantom es medida usando un circuito de tierra-virtual (amplificador U7), mientras que el U8 invierte la señal de corriente a su convención normal, esta sesión permite sensar la corriente que fluye a través de la célula o phantom, mediante la relación entre una tensión de Salida y la resistencia asociada a la ganancia del amplificador U8.

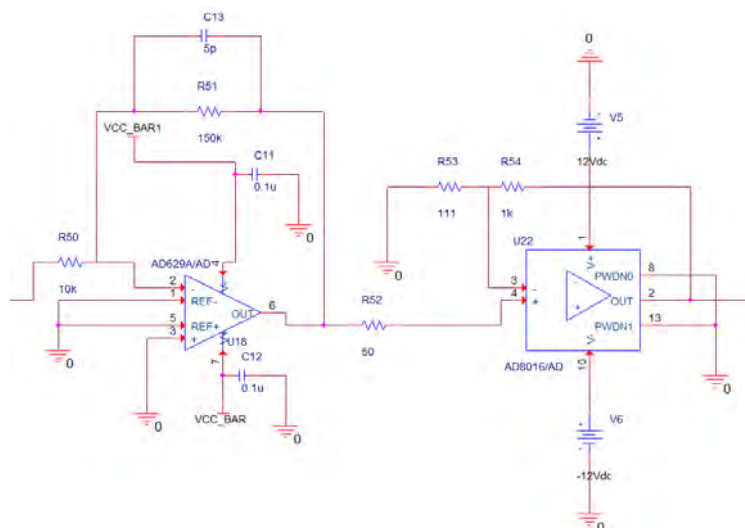
Figura 40. Configuración de conversión de tensión a corriente



6.4 CONVERTIDOR DE TENSIÓN A CORRIENTE – AMPLIFICACIÓN

Para conseguir la etapa alta tensión de salida que permita pasar por un amplificador las corrientes necesarias para la captación de tensión, se emplearon amplificadores especializado el AD629 y el AD8016 con la configuración correspondiente en el concepto de diseño.

Figura 41. Convertidor de tensión a corriente – amplificación



6.5 SENSORES DE TENSIÓN Y DE CORRIENTE

Para sensar la tensión y la corriente de se empleó el microcontrolador Atmel SAM3X8E ARM Cortex-M3 CPU, uno para sensar la tensión y otro la corriente. Para esto se configuro el ADC para que muestreara 20000 datos los almacenara y enviara. Los datos de la salida de **tensión** de la etapa de instrumentación son directamente enviados al puerto A0 del Atmel, como este micro solo acepta tensiones, para sensar la corriente se emplea un divisor, y mediante programación, se calculen los datos correspondan a las magnitudes correctas corriente.

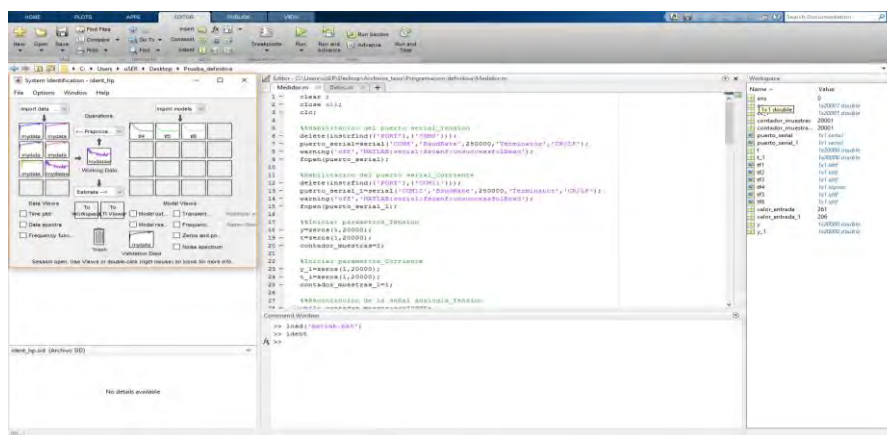
Los datos muestreados son enviados directamente por puerto serial a una velocidad de 250000 baudios hacia PC. Para ver algoritmos dirigirse al anexo (Anexo 2.).

6.6 INTERFAZ GRÁFICO:

6.6.1 Matlab herramienta matemática. Para la identificación del comportamiento eléctrico de la tensión y corriente de sodio se utilizó el software Matlab junto con uno de sus toolbox llamado ident.

Los datos obtenidos de los sensores de tensión y corriente son enviados por puerto serial hacia Matlab, en donde este almacena los datos, y mediante programación se grafica el comportamiento de la tensión y de la corriente en función del tiempo (estos resultados serán mostrados en la sección el apartado de resultados).

Figura 42. Entorno de trabajo de Matlab

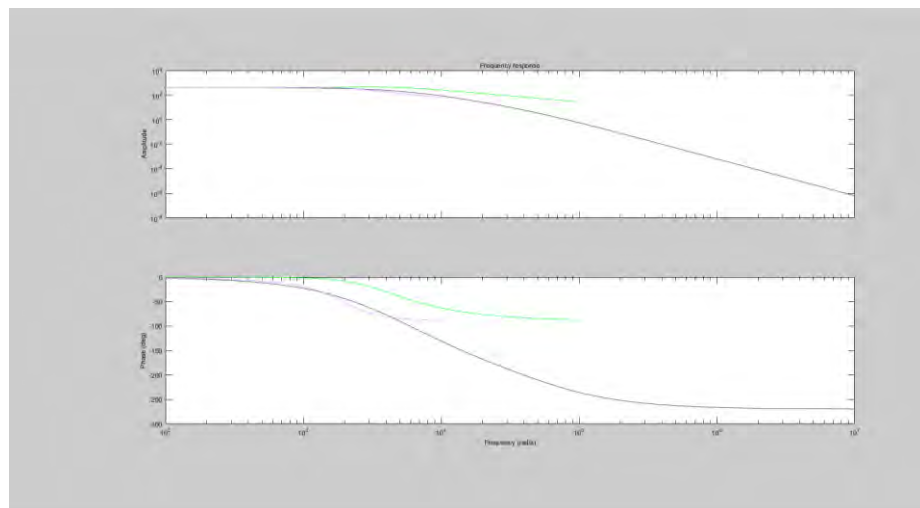


Los datos almacenados se importan al ident, en la pestaña import Data, la corriente como entrada y la tensión como salida, logrando así obtener el parámetro de impedancia. Una de las consideraciones importantes a la hora de importar datos, es seleccionar el correcto tiempo de muestreo, según el teorema de Nyquist la frecuencia de muestreo debe ser como mínimo 2 veces la frecuencia de la señal y para una buena tasa de muestreo mayor o igual a 10 veces la frecuencia de la señal, la máxima señal de trabajo a la que se llegará son 100 kHz lo que equivale a un período de $1.000e-5$ s. En este caso se decidió trabajar a una frecuencia de muestreo de 20 veces la frecuencia de la señal es decir a 20 MHz lo que equivale a $2.000e-6$.

Después de esto se comienza con la estimación de la ecuación de transferencia que mejor se adapte al comportamiento de los datos, para esto se comienza a variar los polos y los ceros de función de transferencia, después de ensayar varios modelos, dependiendo de su nivel de ajuste y el comportamiento de amplitud y fase se selecciona el mejor ajuste.

Para poder seleccionar el modelo que se ajustaba con mayor exactitud se observó el diagrama de bode preliminar proporcionado por el ident el cual se muestra en la figura 43.

Figura 43. diagrama de bode de algunos ajustes



6.7 CÁLCULO DE PARÁMETROS ELÉCTRICOS

En esta etapa se realiza el análisis eléctrico de los datos obtenidos y a partir de estos se plantea un phantom equivalente al tejido estudiado, esta etapa

necesita ciertos procesos sistemáticos para poder obtener los parámetros necesarios, estos procesos se explicarán a continuación:

6.7.1 Cálculo de la parte real (Re) e Imaginaria (Im) de la impedancia. De los datos de magnitud y fase obtenidos del análisis realizado en Matlab son introducen en Excel y partir de las siguientes ecuaciones se obtiene la parte real(Re) e Imaginaria(Im) de la impedancia.

$$Z = \sqrt{Re^2 + Im^2} \quad (20)$$

$$\arctan \left(\frac{Im}{Re} \right) = \phi \quad (21)$$

Despejando y remplazando se obtiene que:

$$Re = \frac{Z}{\sqrt{\tan^2 \phi + 1}} \quad (22)$$

$$Im = \sqrt{Z^2 - Re^2} \quad (23)$$

6.7.2 Cálculo de la Conductancia (Gm) y Capacitancia (Cm). Ya con estos datos se procede a calcular la Conductancia (Gm) y Capacitancia (Cm) despejándola de las siguientes ecuaciones:

$$Re(Z) = \frac{G_m}{G_m^2 + (\omega C_m)^2} \quad (24)$$

$$Im(Z) = \frac{\omega C_m}{G_m^2 + (\omega C_m)^2} \quad (25)$$

Despejando y remplazando se obtiene que:

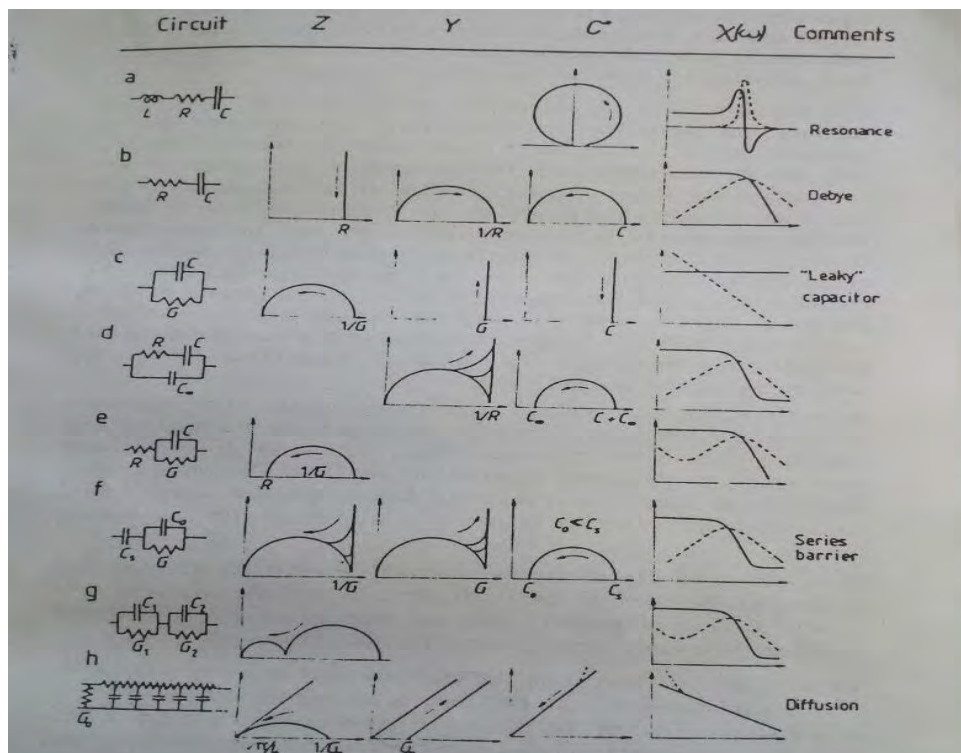
$$G_m = \frac{(\omega * C_m * Re)}{Im} \quad (26)$$

$$C_m = \frac{1}{\omega * \left(\frac{Re^2}{Im} \right) + (Im * \omega)} \quad (27)$$

6.8 ANÁLISIS MATEMÁTICO PARA DISEÑO DEL PHANTOM

Se introducirán los datos Obtenidos en Excel al Origin para graficar el comportamiento eléctrico de la Impedancia, Admitancia, Capacitancia y Conductancia, y comparándolo con las referencias de los modelos eléctricos establecidos en el libro de JONSCHER, Dielectric relaxation in solids (JONSCHER, A. K.1983). Se diseñará un phantom que simule el comportamiento del tejido epitelial bajo estudio.

Figura 44.Representación esquemática de las propiedades de combinación simple circuito ideales

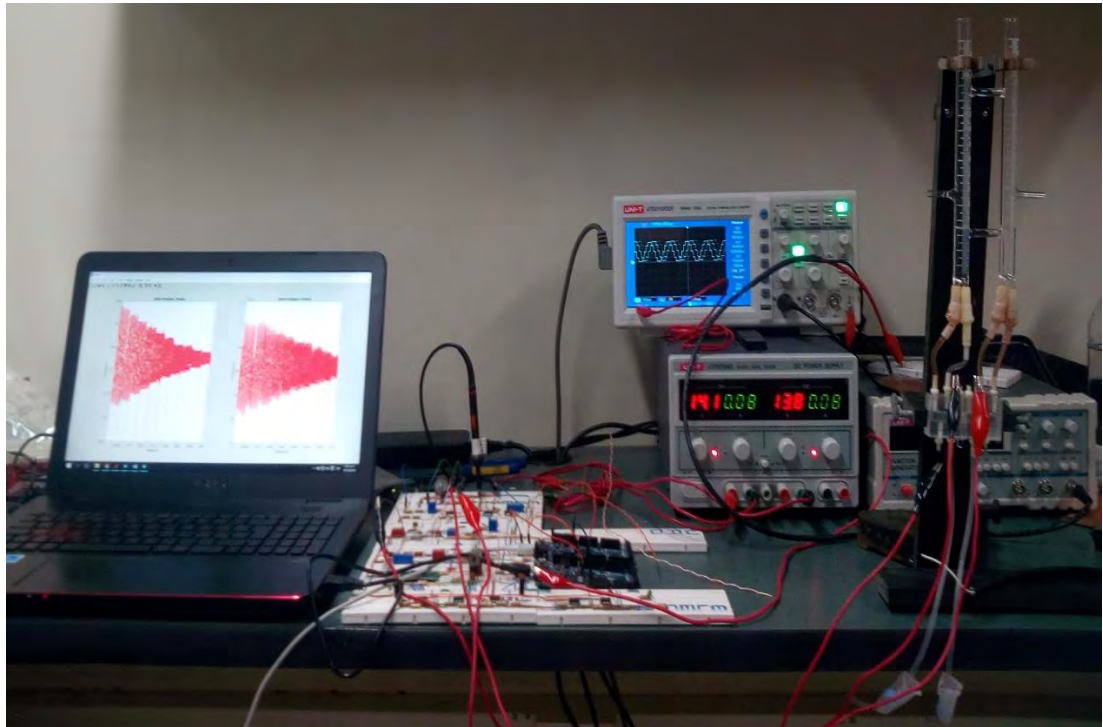


Fuente: JONSCHER, A. K. Dielectric relaxation in solids. London 1983. Chelsea Dielectrics Press, 120 p.

La figura anterior muestra representación esquemática de circuitos simples, la frecuencia - elementos independientes de la capacitancia C , la conductancia G o resistencia R , como se muestra en la primera columna. La segunda recoge la compleja trama plot Z , La tercera plot Y la Admitancia compleja y la cuarta la capacitancia compleja plot C . la quinta columna da la trama correspondiente de registro $C(w)$ (línea continua) y $\log C(w)$ (líneas punteadas), contra w registro. Las observaciones se refieren, al simple significado físico de varios modelos. Las flechas indican el sentido de aumentar la frecuencia, donde más de un contorno en mostrado, estos se refieren a

diferentes razones de los respectivos componentes o constantes de tiempo apropiado.

Figura 45. Sistema de medición en funcionamiento



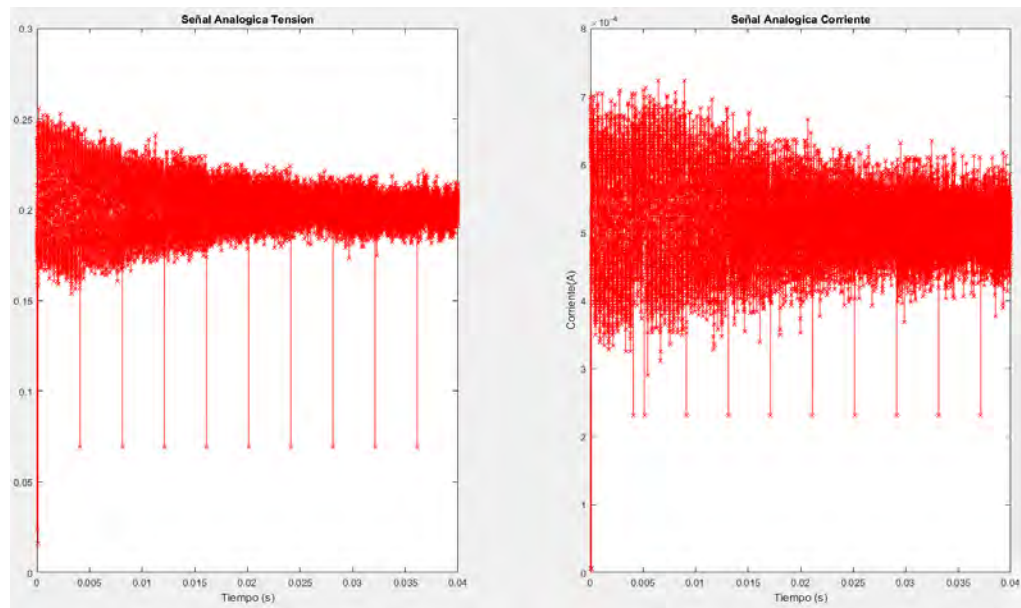
7 DISCUSIÓN Y RESULTADOS OBTENIDOS

En este apartado se muestran las pruebas realizadas con el sistema de medición, para probar el funcionamiento de este y así mostrar el cumplimiento de los objetivos planteados. Los resultados están divididos en tres fases, en la primera se realizaron mediciones al phantom de referencia (Figura 35.) de parámetros de impedancia (magnitud y fase) conocidos obteniendo los parámetros de tensión y corriente correspondiente y a partir de estos datos y de la herramienta ident en Matlab, se calculó la impedancia, esta etapa se realizó con el propósito de calibrar el sistema de medición; en la segunda Fase se obtendrán los mismos parámetros que en la fase anterior a diferencia que esta vez las mediciones se realizarán en dos tejidos epiteliales, también se realizará un análisis eléctrico donde se tomarán los datos correspondientes a dos muestras de tejido epitelial y comparándolo con los modelos y ecuaciones presentes en el libro JONSCHER, A. K. Dielectric relaxation in solids se establecerá un phantom equivalente al tejido medido, la última fase consiste en validar los resultados en donde se medirá las variables eléctricas del nuevo phantom y se describirá si realmente muestra el comportamiento eléctrico de los tejidos estudiados.

7.1 FASE 1 CALIBRACIÓN DEL SISTEMA

7.1.1 Adquisición de datos mediante Arduino y Matlab. Los datos de tensión y corriente obtenidos de la adquisición empleando Arduino y Matlab son mostrados en la figura 46 para ver el código fuente del Arduino y Matlab ver Anexos (3 y 4) respectivamente.

Figura 46. Tensión y corriente media del phantom, obtenidas de la adquisición de datos.



Para identificar el comportamiento del sistema, fue necesaria la estimación de la función de transferencia que lo describe, para esto los datos de tensión y corriente obtenidos fueron enviados al ident de Matlab, donde se selecciona el modelo acorde con el comportamiento de los datos. Como se necesita el parámetro de la impedancia la corriente será la entrada de nuestro sistema y la salida será la tensión así la función de transferencia obtenida describirá la impedancia.

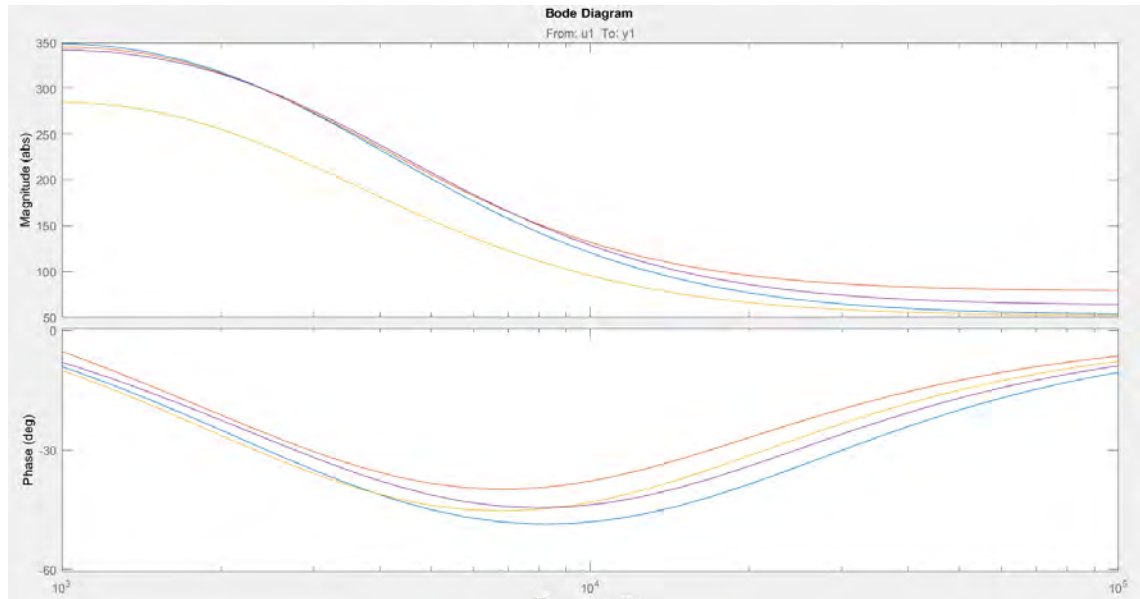
Figura 47. Ecuación de transferencia del phantom y sus diferentes parámetros

```
tf2 =

From input "u1" to output "y1":
52.53 s^2 + 1.16e06 s + 4.385e08
-----
s^2 + 3458 s + 1.57e06
```

Para poder visualizar comportamiento de la magnitud y la fase de la impedancia en función de la frecuencia se realizó un diagrama de bode, la magnitud en (Valor absoluto), fase en (grados) y frecuencia en (kHz), como se puede observar en la Figura 47.

Figura 48. Ensayos realizados al Phantom patrón



En esta grafica se puede observar las diferentes mediciones que se tomaron en el phantom patrón (cada ensayo diferenciado por un color), como se puede observar todos los ensayos tiene un comportamiento eléctrico similar, y si se compara esta grafica con el comportamiento de la figura 35., se puede concluir que la magnitud y fase de la impedancia tienen tendencias semejantes en ambos casos. La magnitud de la impedancia a medida que la frecuencia aumenta esta disminuye, la tendencia que describe la fase también concuerda con la de la figura 35 en la cual la fase disminuye aproximadamente hasta 10kHz y a partir de ahí un punto de inflexión en donde la fase vuelve a aumentar, la similitud de lo medido con el phantom patrón y los valores teóricos esperados permiten concluir que el sistema de medición se encuentra ajustado y que cumple con las especificaciones establecidas.

Como se puede observar en la gráfica se realizaron varias medidas exactamente 4 en donde todas tuvieron un comportamiento aproximadamente igual, esto le brinda confiabilidad a los datos medidos.

7.2 FASE 2 MEDICIÓN A TEJIDO EPITELIAL

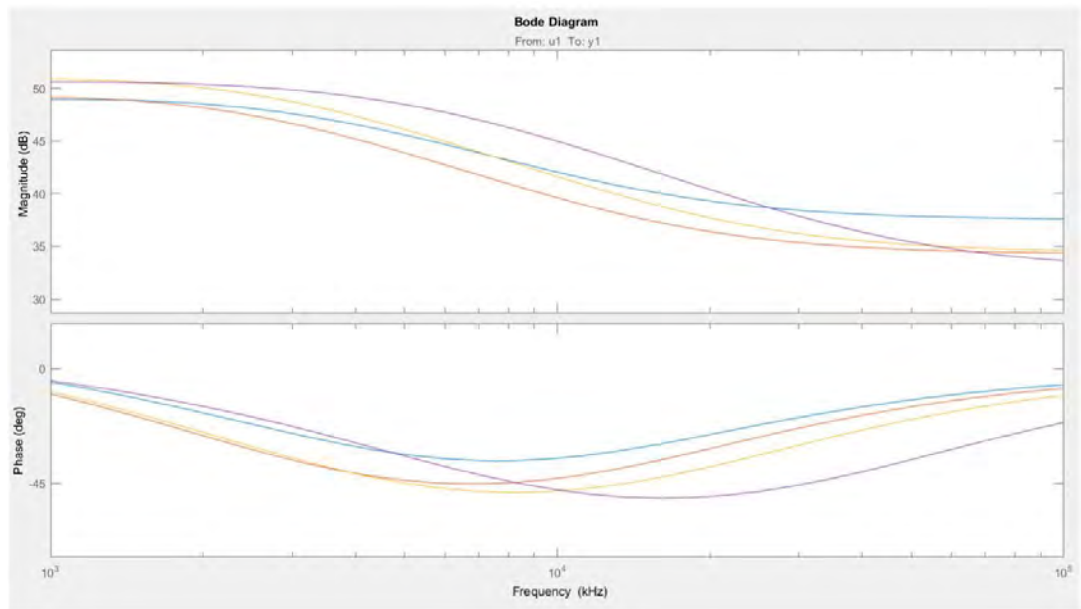
En esta fase se tomaron dos tejidos epiteliales y se realizaron mediciones aproximadamente a 20 minutos de haber extraído el tejido epitelial y someterlo a la inyección de una solución. Dado que la adquisición de tensión y corriente es un

proceso sistemático como se puede observar en la figura 46. En estos datos no se puede apreciar de forma clara el comportamiento de la magnitud y fase de la impedancia, solo se mostraran los resultados obtenidos y no todo el proceso que se realizó para su obtención.

7.2.1 Toma de datos:

Tejido epitelial 1

Figura 49. Diagrama de bode de la impedancia del tejido número 1



La figura 48 muestra el comportamiento de impedancia que describe el primer tejido en varios ensayos, a aquí también se puede observar la tendencia de que al aumentar la frecuencia la impedancia baja y que la fase aproximadamente hasta 10kHz disminuye pero a partir de esta frecuencia comienza a crecer.

Vale la pena destacar que aunque las gráficas tienen un comportamiento similar su correlación no es tan cercana como la que se observa en las mediciones del phantom patrón.

Los datos obtenidos en la hermanita Matlab son exportados a Excel estos son mostrados en la Tabla 11, que incluye los parámetros de Frecuencia, frecuencia

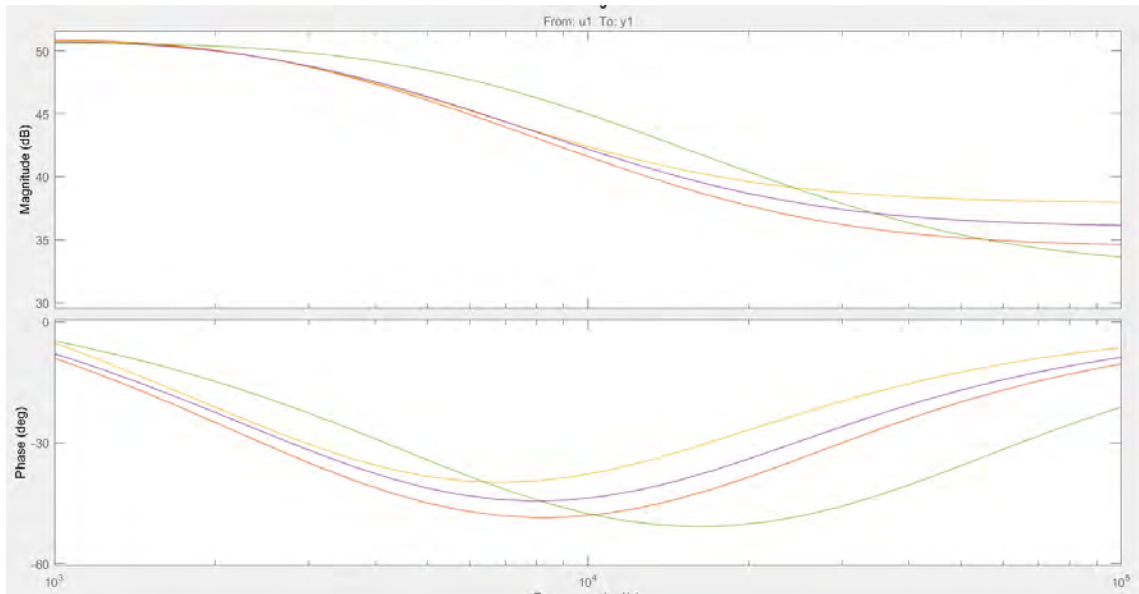
angular, magnitud, fase, parte real e imaginaria de la impedancia, Conductancia y capacitancia.

Tabla 11. Parámetros eléctricos obtenidos de las mediciones realizadas al primer tejido

Frecuencia	W	Magnitud	Fase	Real	Imaginario	Conductancia	Capacitancia
		(Abs)	(Grados)			(Gm)	(Cm)
1000	6283	285,50	-9,95	2,47E+02	1,43E+02	3,03E-03	2,79E-07
1071	6728	284,97	-11,38	1,06E+02	2,65E+02	1,30E-03	4,84E-07
1250	7851	281,94	-14,80	1,74E+02	2,22E+02	2,19E-03	3,56E-07
1458	9161	276,17	-18,46	2,56E+02	1,05E+02	3,35E-03	1,50E-07
1701	10690	267,57	-22,28	2,57E+02	7,50E+01	3,59E-03	9,80E-08
1985	12474	256,20	-26,15	1,35E+02	2,18E+02	2,06E-03	2,66E-07
2316	14555	242,35	-29,97	2,93E+01	2,41E+02	5,00E-04	2,81E-07
2703	16984	226,47	-33,61	1,32E+02	1,84E+02	2,57E-03	2,12E-07
3154	19817	209,17	-36,94	1,51E+02	1,44E+02	3,46E-03	1,66E-07
3680	23124	191,18	-39,84	1,03E+02	1,61E+02	2,81E-03	1,91E-07
4294	26983	173,20	-42,20	3,72E+01	1,69E+02	1,24E-03	2,09E-07
5011	31485	155,86	-43,93	1,56E+02	8,57E+00	6,41E-03	1,12E-08
5847	36739	139,64	-44,98	7,61E+01	1,17E+02	3,90E-03	1,63E-07
6794	42690	125,26	-45,32	2,95E+01	1,22E+02	1,88E-03	1,82E-07
6823	42869	124,88	-45,31	2,95E+01	1,21E+02	1,89E-03	1,82E-07
7961	50023	111,76	-44,94	6,40E+01	9,16E+01	5,13E-03	1,47E-07
9290	58369	100,34	-43,89	9,99E+01	9,21E+00	9,92E-03	1,57E-08
10000	62832	95,48	-43,16	6,52E+01	6,97E+01	7,16E-03	1,22E-07
10840	68109	90,59	-42,22	1,76E+01	8,89E+01	2,15E-03	1,59E-07
12649	79474	82,41	-40,01	5,53E+01	6,11E+01	8,14E-03	1,13E-07
14759	92735	75,67	-37,37	7,16E+01	2,46E+01	1,25E-02	4,63E-08
17222	108209	70,21	-34,43	6,97E+01	8,76E+00	1,41E-02	1,64E-08
20096	126265	65,84	-31,33	6,56E+01	5,69E+00	1,51E-02	1,04E-08
23449	147334	62,41	-28,18	6,22E+01	5,57E+00	1,60E-02	9,71E-09
27362	171919	59,74	-25,11	5,97E+01	1,54E+00	1,67E-02	2,50E-09
31927	200605	57,69	-22,18	5,67E+01	1,08E+01	1,70E-02	1,62E-08
37255	234079	56,13	-19,46	4,60E+01	3,21E+01	1,46E-02	4,36E-08
43471	273138	54,95	-16,98	1,63E+01	5,25E+01	5,39E-03	6,36E-08
50725	318714	54,07	-14,75	3,11E+01	4,42E+01	1,06E-02	4,75E-08
59189	371895	53,41	-12,77	5,23E+01	1,08E+01	1,83E-02	1,02E-08
69065	433951	52,92	-11,03	1,72E+00	5,29E+01	6,14E-04	4,35E-08
80590	506361	52,56	-9,50	5,24E+01	4,21E+00	1,90E-02	3,01E-09
94037	590853	52,29	-8,18	1,68E+01	4,95E+01	6,13E-03	3,07E-08
100000	628320	52,20	-7,70	7,86E+00	5,16E+01	2,88E-03	3,01E-08

Tejido epitelial 2

Figura 50. Diagrama de bode de la impedancia del tejido número 2



La figura 49 igual que la figura 48 tiene mismo comportamiento en donde al aumentar la frecuencia la impedancia baja y que la fase aproximadamente hasta 10kHz disminuye pero a partir de esta frecuencia comienza a crecer.

Este comportamiento es normal, así las medidas se hayan hecho sobre dos tejidos epiteliales, el tejido epitelial de animales de la misma especie en este caso anfibios en general tiene características anatómicas y fisiológicas iguales de ahí la similitud entre los resultados, esto datos brindan una característica del sistema de medición que es la capacidad de detectar los comportamientos eléctricos de un tipo de tejido específico sin generar ambigüedades en los parámetros.

Tabla 12. Parámetros eléctricos obtenidos de las mediciones realizadas al según tejido

Frecuencia	W	Magnitud	Fase	Real	Imaginario	Conductancia	Capacitancia
		(Abs)	(Grados)			(Gm)	(Cm)
1000	6283	251,61	-4,22	1,18E+02	2,22E+02	1,87E-03	5,58E-07
1016	6387	251,60	-4,29	1,02E+02	2,30E+02	1,62E-03	5,68E-07
1185	7447	251,50	-5,01	7,40E+01	2,40E+02	1,17E-03	5,10E-07
1382	8684	251,36	-5,85	2,28E+02	1,05E+02	3,61E-03	1,92E-07
1612	10126	251,17	-6,83	2,14E+02	1,31E+02	3,39E-03	2,06E-07
1879	11807	250,91	-7,99	3,33E+01	2,49E+02	5,29E-04	3,35E-07
2191	13768	250,52	-9,34	2,50E+02	2,09E+01	3,98E-03	2,42E-08
2555	16054	249,97	-10,93	1,53E+01	2,49E+02	2,45E-04	2,49E-07
2979	18720	249,15	-12,81	2,42E+02	6,07E+01	3,89E-03	5,23E-08
3474	21829	247,94	-15,03	1,93E+02	1,55E+02	3,14E-03	1,16E-07
4051	25454	246,12	-17,65	8,98E+01	2,29E+02	1,48E-03	1,49E-07
4724	29681	243,37	-20,75	7,78E+01	2,31E+02	1,31E-03	1,31E-07
5508	34610	239,22	-24,38	1,74E+02	1,64E+02	3,04E-03	8,29E-08
6423	40357	233,04	-28,58	2,22E+02	7,08E+01	4,09E-03	3,23E-08
7490	47059	224,10	-33,35	7,86E+01	2,10E+02	1,57E-03	8,88E-08
8733	54873	211,79	-38,54	1,42E+02	1,57E+02	3,16E-03	6,39E-08
10000	62832	198,00	-43,26	1,49E+02	1,31E+02	3,79E-03	5,31E-08
10184	63985	195,95	-43,89	1,95E+02	1,78E+01	5,08E-03	7,24E-09
11875	74611	177,17	-49,03	5,78E+01	1,67E+02	1,84E-03	7,15E-08
13847	87000	156,79	-53,52	1,56E+02	1,84E+01	6,33E-03	8,62E-09
16146	101448	136,44	-57,05	1,20E+02	6,52E+01	6,44E-03	3,45E-08
18827	118294	117,49	-59,41	1,13E+02	3,27E+01	8,18E-03	2,00E-08
21953	137938	100,73	-60,58	6,38E+01	7,80E+01	6,28E-03	5,57E-08
23852	149870	92,71	-60,73	4,67E+01	8,01E+01	5,43E-03	6,22E-08
25599	160844	86,44	-60,62	5,15E+01	6,95E+01	6,89E-03	5,78E-08
29850	187554	74,53	-59,68	7,45E+01	8,89E-01	1,34E-02	8,53E-10
34807	218699	64,76	-57,88	1,52E+01	6,29E+01	3,63E-03	6,86E-08
40587	255016	56,81	-55,38	2,20E+01	5,24E+01	6,83E-03	6,36E-08
47327	297364	50,39	-52,30	2,24E+01	4,52E+01	8,81E-03	5,98E-08
55186	346744	45,24	-48,78	3,73E+00	4,51E+01	1,82E-03	6,35E-08
64350	404324	41,15	-44,96	2,31E+01	3,40E+01	1,37E-02	4,97E-08
75036	471466	37,91	-40,97	3,76E+01	4,85E+00	2,62E-02	7,15E-09
87496	549757	35,39	-36,95	2,58E+01	2,42E+01	2,06E-02	3,51E-08
100000	628320	33,65	-33,51	1,69E+01	2,91E+01	1,49E-02	4,09E-08

7.2.2 Análisis Matemático. Para el análisis matemático se toman los datos de impedancia específicamente la parte real e imaginaria de la impedancia y se grafican en Origin los resultados se muestran en las figura 51 y 52.

Figura 51. Impedancia Tejido 1

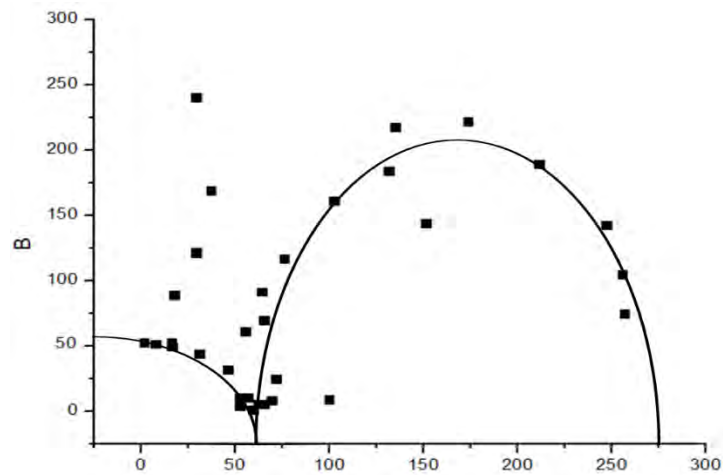
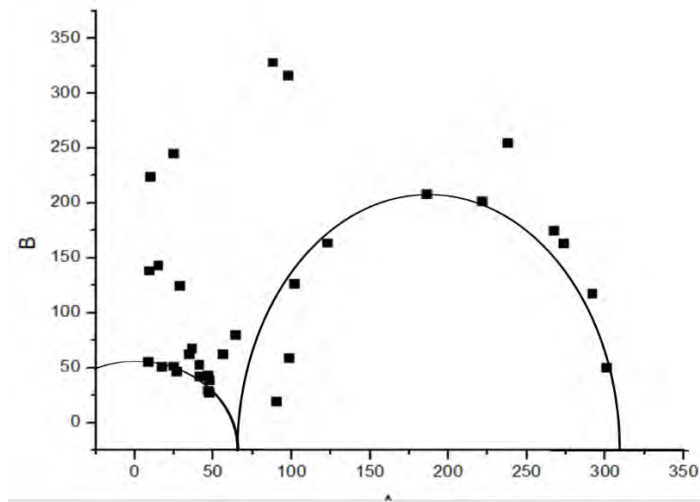
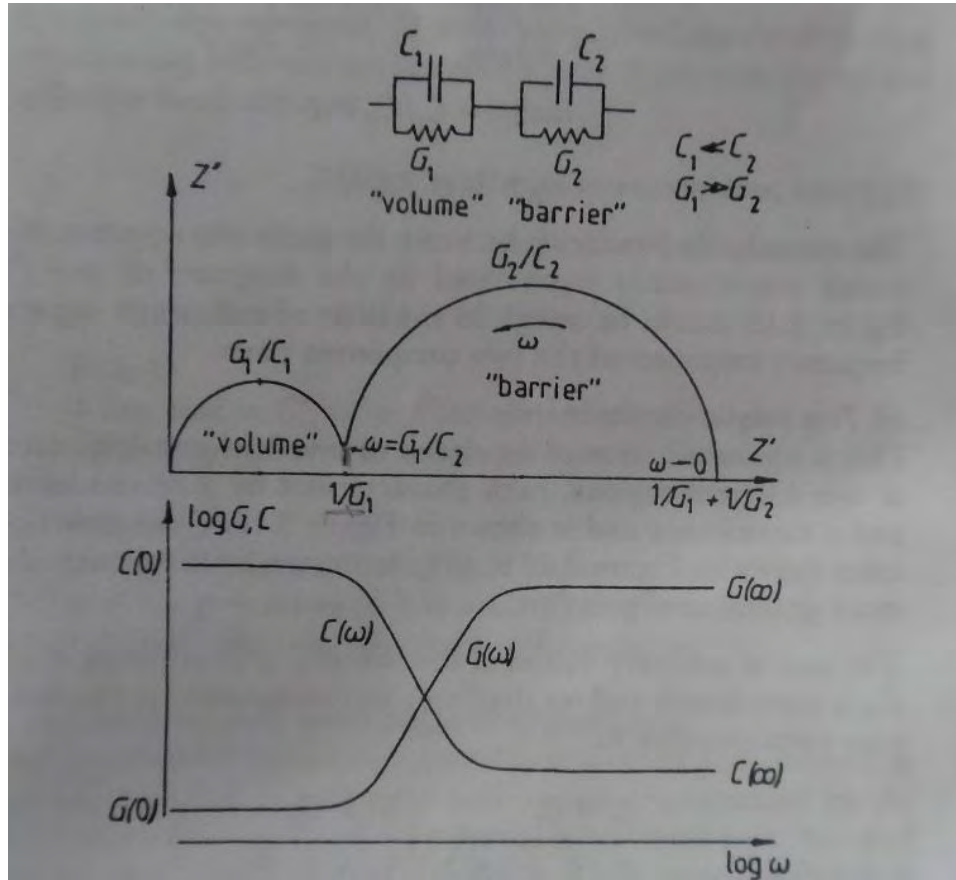


Figura 52. Impedancia compleja Tejido 2



Basándose en el libro JONSCHER, A. K. Dielectric relaxation in solids. London 1983. Chelsea Dielectrics Press, 71- 83 p, se determine que el comportamiento de los datos cumple con el siguiente modelo.

Figura 53. Representación de la impedancia compleja y la dependencia de la combinación serie paralelo de la capacitancia y la conductancia de la frecuencia.



De acuerdo a este modelo se determinaron el siguiente parámetro y sus respectivas representaciones en componentes electrónicos.

7.2.3 Diseño del Phantom.

Análisis matemático Tejido 1

Corte en el eje X

$$1/G_1 = 52 = R_1$$

$$G_1 = 1.92 \times 10^{-2}$$

$$\omega = G_1/C_2 \quad \omega = 506361$$

$$C_2 = 3.80 \times 10^{-8}$$

Pico semicírculo Mayor

$$\omega = G_2/C_2 \quad \omega = 7851$$

$$G_2 = 2.98 \times 10^{-4}$$

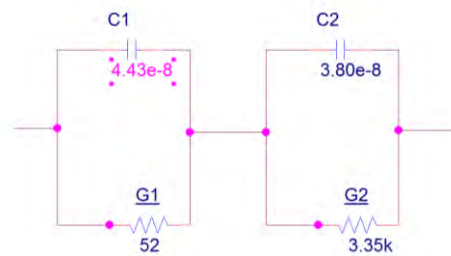
$$R_2 = 3.35 \text{ k}\Omega$$

Pico semicírculo Menor

$$\omega = G_1/C_1 \quad \omega = 433951$$

$$C1=4.43e-8$$

Figura 54. Phantom tejido 1



Análisis matemático Tejido 2

Corte en el eje X

$$1/G1 = 46 = R1$$

$$G1 = 2.17e-2$$

$$\omega = G1/C2 \quad \omega = 497374$$

$$C2 = 4.36e-8$$

Pico semicírculo Mayor

$$\omega = G2/C2 \quad \omega = 16807$$

$$G2 = 7.34e-4$$

$$R2 = 1.36k\Omega$$

Pico semicírculo Menor

$$\omega = G1/C1 \quad \omega = 365543$$

$$C1 = 5.94e-8$$

Figura 55. Phantom tejido 2

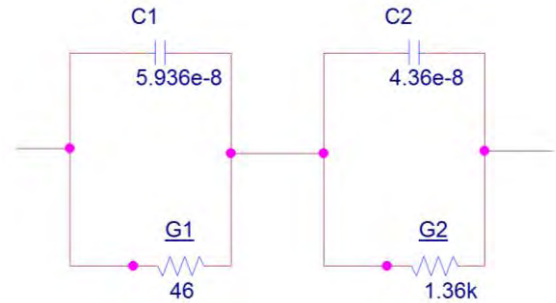


Tabla 13. Tabla de comparación entre componentes

	Componentes			
	C1	R1	C2	R2
Phathom 1	4,43E-08	52	3,80E-08	3,35k
Phathom2	5,94E-08	46	4,36E-08	1,36k

Se puede observar que tanto los datos correspondientes al tejido 1 como al tejido 2 tiene comportamiento similares, las gráficas 51 y 52 muestran que la impedancia compleja es similar en ambos casos también se puede notar que los componentes tiene valores cercanos lo que da veracidad a las mediciones, además de que los comportamientos que describen ambos tejidos son los que se esperan según la bibliografía en donde se modela un tejido con un equivalente circuital con la misma estructura obtenida experimentalmente , lo que es uno de los propósitos de este proyecto, replicar los resultados de técnicas convencionales con el sistema de medición desarrollado.

7.3 FASE 3: VALIDACIÓN

Esta fase está basada en la medición de los parámetros eléctricos a uno de los Phantom diseñados experimentalmente, el phantom seleccionado es el número dos, el proceso de medición será igual al implementado en la medición de tejidos.

Figura 56. Diagrama de bode de la impedancia del phantom

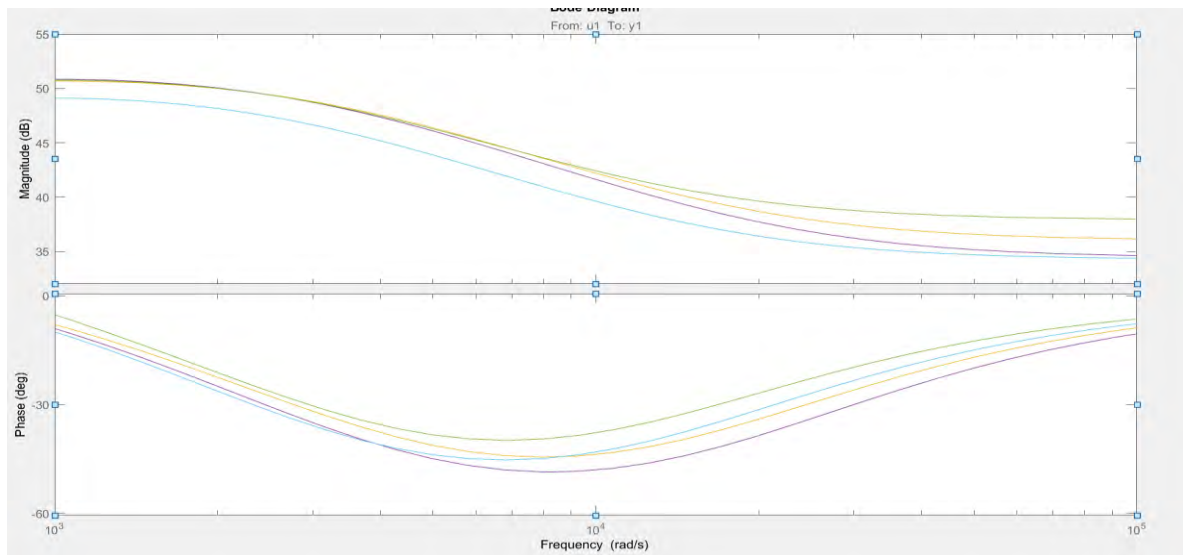


Tabla 14 Parámetros eléctricos obtenidos de las mediciones del phantom 2

Frecuencia	W	Magnitud	Fase	Real	Imaginario	Conductancia	Capacitancia
		(Abs)	(Grados)			(Gm)	(Cm)
1000	6283	251,61	-4,22	1,18E+02	2,22E+02	1,87E-03	5,58E-07
1016	6387	251,60	-4,29	1,02E+02	2,30E+02	1,62E-03	5,68E-07
1185	7447	251,50	-5,01	7,40E+01	2,40E+02	1,17E-03	5,10E-07
1382	8684	251,36	-5,85	2,28E+02	1,05E+02	3,61E-03	1,92E-07
1612	10126	251,17	-6,83	2,14E+02	1,31E+02	3,39E-03	2,06E-07
1879	11807	250,91	-7,99	3,33E+01	2,49E+02	5,29E-04	3,35E-07
2191	13768	250,52	-9,34	2,50E+02	2,09E+01	3,98E-03	2,42E-08
2555	16054	249,97	-10,93	1,53E+01	2,49E+02	2,45E-04	2,49E-07
2979	18720	249,15	-12,81	2,42E+02	6,07E+01	3,89E-03	5,23E-08
3474	21829	247,94	-15,03	1,93E+02	1,55E+02	3,14E-03	1,16E-07
4051	25454	246,12	-17,65	8,98E+01	2,29E+02	1,48E-03	1,49E-07
4724	29681	243,37	-20,75	7,78E+01	2,31E+02	1,31E-03	1,31E-07
5508	34610	239,22	-24,38	1,74E+02	1,64E+02	3,04E-03	8,29E-08
6423	40357	233,04	-28,58	2,22E+02	7,08E+01	4,09E-03	3,23E-08
7490	47059	224,10	-33,35	7,86E+01	2,10E+02	1,57E-03	8,88E-08
8733	54873	211,79	-38,54	1,42E+02	1,57E+02	3,16E-03	6,39E-08
10000	62832	198,00	-43,26	1,49E+02	1,31E+02	3,79E-03	5,31E-08
10184	63985	195,95	-43,89	1,95E+02	1,78E+01	5,08E-03	7,24E-09
11875	74611	177,17	-49,03	5,78E+01	1,67E+02	1,84E-03	7,15E-08
13847	87000	156,79	-53,52	1,56E+02	1,84E+01	6,33E-03	8,62E-09
16146	101448	136,44	-57,05	1,20E+02	6,52E+01	6,44E-03	3,45E-08
18827	118294	117,49	-59,41	1,13E+02	3,27E+01	8,18E-03	2,00E-08
21953	137938	100,73	-60,58	6,38E+01	7,80E+01	6,28E-03	5,57E-08
23852	149870	92,71	-60,73	4,67E+01	8,01E+01	5,43E-03	6,22E-08
25599	160844	86,44	-60,62	5,15E+01	6,95E+01	6,89E-03	5,78E-08
29850	187554	74,53	-59,68	7,45E+01	8,89E-01	1,34E-02	8,53E-10
34807	218699	64,76	-57,88	1,52E+01	6,29E+01	3,63E-03	6,86E-08
40587	255016	56,81	-55,38	2,20E+01	5,24E+01	6,83E-03	6,36E-08
47327	297364	50,39	-52,30	2,24E+01	4,52E+01	8,81E-03	5,98E-08
55186	346744	45,24	-48,78	3,73E+00	4,51E+01	1,82E-03	6,35E-08
64350	404324	41,15	-44,96	2,31E+01	3,40E+01	1,37E-02	4,97E-08
75036	471466	37,91	-40,97	3,76E+01	4,85E+00	2,62E-02	7,15E-09
87496	549757	35,39	-36,95	2,58E+01	2,42E+01	2,06E-02	3,51E-08
100000	628320	33,65	-33,51	1,69E+01	2,91E+01	1,49E-02	4,09E-08

Si se comparan las figuras 49 y 56 se concluye que los comportamientos son similares, en la gráfica 56 la impedancia baja a medida que la frecuencia aumenta y la fase disminuye hasta 10kHz y luego comienza a crecer, este comportamiento es el que describen las medidas realizadas en tejido y la que describe la bibliografía, esto permite concluir que el phantom diseñado de manera experimental describe el comportamiento de los tejidos considerándose un buen modelo, validando la metodología, el desarrollo del sistema de medición y el cumplimiento de los objetivos planteados.

8 CONCLUSIONES

Las medidas realizadas tanto en tejido epitelial como en los phantom experimental y de referencia tienen un comportamiento similar, en cuanto a la magnitud de la impedancia disminuye a medida que la frecuencia aumenta y en el caso de la fase disminuye hasta aproximadamente 10 kHz en donde la curva tiene un punto de inflexión y empieza a incrementar (Figura 47, Figura 48, Figura 49, Figura 56). Sin embargo, vale la pena mencionar que en el caso de los tejidos, las medidas efectuadas a diferentes tiempos desde la extracción de la muestra hasta la medición de la impedancia, describen una variación en el su comportamiento (Figura 49, Figura 48), se observa un desplazamiento en las algunas curvas, estas curvas desplazadas corresponde a los últimos ensayos realizados. Teniendo en cuenta lo anterior, se podría concluir que la característica predominante es que la impedancia eléctrica aumenta a medida que aumenta el tiempo transcurrido desde la extracción del tejido hasta la obtención de los datos debido a la deshidratación del tejido, lo cual se ve reflejado en una disminución de la conductividad y por ende un aumento en la impedancia eléctrica.

En el caso de los phantoms (de referencia y experimentales) se puede observar (Figura 47, Figura 49) que estos ensayos tienen resultados más homogéneos, es decir, el comportamiento de las gráficas de impedancia tiene una mejor correlación, esto debido a que los componentes electrónicos tienen estándares con tolerancias ya preestablecidas lo que se ven reflejadas en un comportamiento más uniforme, a diferencia de los tejidos en los cuales influyen diferentes factores tanto del tejido como hidratación, la forma del tejidos etc. o del medio como la temperatura, la metodología en que se toman los datos etc. Todos estos factores favorecen la variabilidad de los datos.

Al momento de realizar la toma de datos se hace necesario tener en cuenta diferentes condiciones como son: el tiempo comprendido entre el instante en que el tejido es extraído y puesto en sistema de inyección de soluciones y el momento en el que se realizan las mediciones debe ser el menor posible, para esto fue necesaria la optimización de los tiempos de medición y la rapidez al hacer el transporte de la muestra y las conexiones con el equipo. Cabe destacar la importancia de la habilidad de la persona encargada de extracción del material puesto que, es indispensable que la cantidad de muestra sea suficiente para cubrir el orificio donde se coloca el tejido; del mismo modo, que el extendido sea realizado de forma uniforme, también es necesario que la muestra permanezca en un medio en el cual se retarde el proceso de deshidratación; igualmente no se pueden dejar a un lado todos los requerimientos de seguridad que se deben cumplir para el trabajo con material biológico.

Por otro lado, la temperatura de la muestra deber ser tan parecida como sea posible a la temperatura corporal evitando de esta forma cambios en las características del tejido.

Con relación a la pregunta problema plateada se puede decir que el sistema de medición desarrollado permite obtener el espectro de impedancia eléctrica para diferentes muestras de tejido epitelial, por medio de la medición de tensión producida por el flujo de la corriente y visualizar el espectro de impedancia comprendido en la zona de relajación β , que describe el comportamiento bioeléctrico de los tejidos, lo que corresponde a uno de los objetivos plateados, replicar los resultados obtenidos con las técnicas de medición convencionales, sin embargo, como se pudo observar en las gráficas (Figura 47 y figura 49) el comportamiento de los tejidos tiene ruido que puede corresponder a factores externos ya sea de la instrumentación o de los electrodos, esta anomalía no permite diseñar un phantom exacto del tejido, para diseñar un modelo más preciso se requería tener en cuenta los factores externos y un planteamiento matemático de estos.

Observaciones. A la hora de escoger lo integrados se encontró con varios inconvenientes, primero dado que las frecuencias de trabajo son altas, los integrados no funcionan de forma óptima en estos rangos; otro inconveniente fueron las magnitudes de trabajo, estas son muy pequeñas siendo difícil su acondicionamiento, para esto se implementaron etapas de amplificación, filtrada y dos integrados especializados el AD629 y el AD8016, el primero actuando como conversor de tensión a corriente y el segundo como amplificación.

En la selección de sensores y el generador de onda sinusoidal también se tuvieron algunos problemas, en el caso del sensor de corriente se tuvo como primera opción el sensor ACS712 pero este no tenía la suficiente resolución para medir cambios de corriente tan pequeños. Partiendo de esto se decidió utilizar un microcontrolador que muestreara las señales de tensión y de corriente funcionando como sensor, para esto se realizó una selección de entre tres Arduinos: Arduino Uno, Arduino mega y Arduino Due de los cuales se seleccionó el Arduino Due por su características técnicas en especial por su velocidad de reloj de 84 MHz, como las entradas del Arduino solo detectan tensión, para poder medir la corriente se realizó un divisor de tensión y mediante programación en el software Matlab que determinaba la magnitud exacta de la corriente.

BIBLIOGRAFIA

ACOSTA, Andrés. Ranas, Salamandras y Caecilias (Tetrapoda: Amphibia) de Colombia. [En línea]. Santiago de Cali. Pontificia Universidad Javeriana. Diciembre, 2000, vol. 1, no.3, p. 20 [consultado 20 Noviembre 2016] Disponible en internet: <http://www.redalyc.org/pdf/491/49110303.pdf>

ALEMAN, Iguran, Belis Paola. PAEZ DURAN, Blanca Isabel. Modelado y simulación de propiedades eléctricas de tejido epitelial estratificado sano. Trabajo de grado para optar al título de Ingenieras Electrónicas. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, Facultad de ingenierías físico- mecánicas, Escuelas de ingeniería Eléctrica, Electrónica y Telecomunicaciones, 2006. 202 p.

ALLAN R Willms NEUROFIT: software for fitting Hodgkin–Huxley models to voltage-clamp data Department of Mathematics and Statistics, Biomathematics Research Centre, University of Canterbury, Private Bag 4800, Christchurch, New Zealand, December, 2010, 18 p.

ALON POLEG, Polsky. DIAMOND, Jeffrey S. Imperfect Space Clamp Permits Electrotonic Interactions between Inhibitory and Excitatory Synaptic Conductances, Distorting Voltage Clamp Recordings[en línea].Base de datos PMC, 2011 Abril 29 [consultado 20 enero de 2016].Disponible en internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3085473/>

ARCE, Víctor. Endocrinología. Universidad de Santiago de Compostela, 2006.417.p

AVILA POZOS, R y GODINEZ FERNANDEZ, J.R. Voltage Clamp System with a very low noise Probe for Electrophysiological Measurements. Publicado en: 5th International Conference on Electrical Engineering, Computing Science and Automatic Control (CCE 2008) 8 p.

Base de datos Arduino. [en línea] Arduino Disponible en: <http://www.arduino.cc/en/Reference/HomePage> [Consulta: enero 20 -2016]

BOURNE John R. Bioelectrical Impedance Techniques in Medicine. En: Critical Reviews in Biomedical Engineering. New York. 1996, vol, 24, no, 4-6. 484 p

BORDONS MARTINEZ, Carlos. Clasificador de Impedancias borroso utilizando plataforma Arduino. Escuela técnica Superior de Ingeniería. Sevilla: Universidad de Sevilla. Departamento Ingeniería de Sistemas y Automática, 2015. 40 p.

BROWN B. H et al. Modelled current distribution in cervical squamous tissue. En: Physiol Meas, U.K: October, 2001,, vol, 23. p.6.

CABRERA LÓPEZ, John Jairo. VELASCO MEDINA, Jaime. RODRÍGUEZ DENIS, Ernesto. BRICEÑO CALDERÓN, Juan Felipe. GÓMEZ GUEVAR, Oscar Julián. Bioimpedance Measurement Using Mixed-Signal Embedded System. Publicado en: VII Latin American Symposium on Circuits and Systems (LASCAS) 2016

CASAS, O. Contribución a la Obtención de Imágenes Paramétricas en Tomografía de Impedancia Eléctrica para la Caracterización de tejidos Biológicos. Tesis Doctoral. Barcelona Universidad Politécnica de Cataluña, Septiembre de 1998. 60 p

C. Gabriel, S Gabriel. The dielectric properties of biological tissues: I. Literature. En: Survey Physics in Medicine and Biology, 2 April 1996, vol. 41, no. 11. 10 p

COLE K.S y COLE R. H. Dispersion and absorption in dielectrics. Journal of Chemical Physics, 1941. Vol, 9, p. 330-351

CUBIDES DIAZ, Yorlen A. y MIELES PINTO, Fidel E. Diseño de una fuente de corriente sinusoidal y pulsos bifásicos para medición de espectro de impedancia eléctrica en tejido humano. Universidad Industrial de Santander. Facultad de ingenierías físico-mecánicas. Escuela de ingenierías eléctrica, electrónica y telecomunicaciones. Bucaramanga 2006. 60 p.

Datos y cifras sobre el cáncer. [en línea]. Organización Mundial de la Salud, Febrero de 2017 [consultado 20 Enero del 2016]. Disponible en internet: <http://www.who.int/cancer/about/facts/es/>

DE ROBERTIS, Eduardo. Hi, Jose. Fundamentos de biología celular y molecular de Robertis. 4 ed. Buenos Aires: Editorial el Ateneo, 2004. p.120.

DIAZ, Elver. Establecimiento de un sistema de registro de transporte de sodio transepitelial, empleando como biomodelo la piel de *eleutherodactylus johnstonei*. Trabajo de grado de químico farmacéutico. Santiago de Cali: Universidad ICESI, Facultad de ciencias naturales. 2014. p. 50.

DIETER, Jaeger. Ranu, Jung. Encyclopedia of Computational Neuroscience. New York: Springer Science, 2015. 3229 p.

Eleutherodactylus johnstonei (Johnstone's Rain Frog). [en línea]. The Online Guide to the Animals of Trinidad and Tobago. November, 2014. 4 p. [consultado 20 de Noviembre 2016] Disponible en internet: https://sta.uwi.edu/fst/lifesciences/documents/Eleutherodactylus_johnstonei.pdf

Enfermedades de la neurona motora. [en línea]. Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Accidentes Cerebrovasculares, Diciembre 20 del 2016. [Consultado en Noviembre 4 del 2016] Disponible en internet: https://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/enfermedades_de_la_neurona_motora.htm

Example of driving ADC and DAC from timer for regular sampling. [en línea] Arduino Disponible en: <http://forum.arduino.cc/index.php?topic=205096.0>

FARIÑAS, Wilfredo. Paz, Zenaida. Orta, Gregorio. Denis, Ernesto. Estudio del factor de perdida dieléctrica de tejidos mamarios en condiciones patológicas y tejido mamario en condiciones normales. La habana Cuba. En: Memorias II Congreso Latinoamericano De Ingeniería Biomédica, Habana Cuba 2001, Mayo 23 -25, 2001. 8 p

FOSTER, K. and Schwan, H.P. Dielectric properties of tissues. In Polk, Handbook of Biological Effects of electromagnetic Fields. Physics Department, King's College, Strand, London

FARIÑAS.CORONADO, Wilfredo *et al.* Estudio del factor de disipación dieléctrica como herramienta diagnóstica. La Habana, Cuba: Centro de Bioingeniería ISPJAE, 2002. p. 249-255.

FONTHAL RICO, Faruk. Fabricación y caracterización de dispositivos basados en Silicio Poroso sobre c-Si: Aplicaciones eléctricas y ópticas. Universidad Rovira y Virgili. Departamento de Electrónica, Eléctrica y Automática. Tarragona, España 2006. p. 105-118.

FRED, Julian. Moore, John. GOLDMAN David E. Current-Voltage Relations in the Lobster Giant Axon Membrane Under Voltage Clamp Conditions. En: The journal of general physiology. 1962, vol, p. 45. 40.

FRENKI [en línea] Fast analogRead with Arduino Due. Disponible en: <http://frenki.net/2013/10/fast-analogread-with-arduino-due/>

Geddes I. The impedance of stainless steel electrodes. [en línea]. En: Medical and Biological Engineering and Computing. 1971, vol. 9, no. 5, p. 511-521. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5159049>

GERALD, Karp. Biología celular y molecular: Conceptos y experimentos. 5 ed McGrawHill. 820 p.

GITHUB [en línea] The Timer Counter blocks of Arduino Due's AT91SAM3X8E. Disponible en: <https://github.com/ivanseidel/DueTimer/blob/master/TimerCounter.md>

GRAOVAC, Milan. SMITH, K. C. MARTENS, James. Novel Lead Configurations for Robust Bio-Impedance Acquisition. Publicado en: Proceedings of the 29th Annual International Conference of the IEEE EMBS. August 23-26, 2007.

GUOFENG, Qiao. WEI, Wang. WEI, Duan. FAN, Zheng. SINCLAIR, Alison J., and CHATWIN, Chris R. Bioimpedance Analysis for the Characterization of Breast Cancer Cells in Suspension publicado en: IEEE TRANSACTIONS ON BIOMEDICAL ENGINEERING, August, 2012 vol. 59, Nov. 8.

GURKIEWICZ, Meron. Korngreen, Alon. A Numerical Approach to Ion Channel Modelling Using Whole-Cell Voltage-Clamp Recordings and a Genetic Algorithm. Base de datos OMC, August, 2007. vol, 3. no, 8.

HALLIWELL, James V. Plant, Tim D. Robbins, Jon. Standen, Nick B. Voltage clamp techniques. The University of Texas, Dallas. [consultado en enero 2016] Disponible en internet: http://www.utdallas.edu/~tres/microelectrode/microelectrodes_ch02.pdf

High Common-Mode Voltage, Difference Amplifier AD629 [en línea] Analog Devices Disponible en: <http://www.analog.com/media/en/technical-documentation/data-sheets/AD629.pdf>

ILDEFONSE, Michele. ROUGIER, Oger. Voltage—clamp analysis of the early current in frog skeletal muscle fibre using the double sucrose-gap method. Publicado en: The journal of Physiology. Apr 1972

Introducción a Arduino. [en línea] Arduino Disponible en <http://www.arduino.cc/es/pmwiki.php?n=> [Consulta: agosto 3 -2016]

IVORRA A. Medidas multifrecuenciales de impedancia eléctrica en tejidos Biológicos. Barcelona, España: Departamento de Bioanalítica Médica e instituto de investigaciones Biomédicas de Barcelona CSIC

JFET Input Operational Amplifiers LF356.[en línea] Natinal semiconductor Disponible en: <http://pdf.datasheetcatalog.com/datasheet/nationalsemiconductor/LF356.pdf>

JONSCHER, A. K. Dielectric relaxation in solids. London 1983. Chelsea Dielectrics Press, 71- 83 p.

Khalil, Sami F.Mohktar, Mas S.Ibrahim, Fatimah The Theory and Fundamentals of Bioimpedance Analysis in Clinical Status Monitoring and Diagnosis of Diseases Published online 2014 Jun 19. 24 p.

KRIERGER, Scott. Biología Celular y Molecular. 5 ed. Editorial Médica panamericana, 746 p.

LIVIU, Breniuc. and VALERIU David. Wearable Impedance Analyzer Based on AD5933 publicado en 2014 International Conference and Exposition on Electrical and Power Engineering (EPE 2014), 16-18 October, Iasi, Romania

Los trastornos neurológicos afectan a millones de personas en todo el mundo [en línea] Organización Mundial de la Salud, Enero 06 del 2017 [consultado Noviembre 4 del 2016]. Disponible en internet: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2007/pr04/es/>

Low Power, High Output Current xDSL Line Driver AD8016 [en línea] Analog Devices Disponible en: <http://www.analog.com/media/en/technical-documentation/data-sheets/AD8016.pdf>

MADISON, D. V. LANCASTER, B. y NICOLL R. A. Voltage Clamp Analysis of Cholinergic Action in the Hippocampus. Departments of Pharmacology and Physiology, University of California, San Francisco, California 94143, En: The Journal of Neuroscience, March 1987.

MARGO, Cedric. Katrib, Juliano. NADI, Mustapha. Four electrode embedded bioimpedance measurement system. Base de datos IEEE 2013

Mathworks. [en línea]. Mathworks: Definición de MATLAB [Consultado el 10 de junio 2016] Disponible en: <http://es.mathworks.com/products/matlab/>

MEDRANO, G. Modeling the Influence of Body Position in Bioimpedance Measurements. Proceedings of the 29th Annual International Conference of the IEEE EMBS. Agosto 22-26, 2007. 28 p.

MONCADA, María E., *et al.* Medición de impedancia eléctrica en tejido biológico. En: Revista Tecno Lógicas. Diciembre, 2010, no, 25, 26 p.

MONTOYA CARDONA, Juan C. Sistema de adquisición de biopotencial para entornos académicos. Escuela de ingeniería de Antioquia. Universidades CES. Envigado 2013. p. 25 – 29.

MOORE, John W. Voltage Clamp [en línea] Scholarpedia, 2007 [consultado Junio 28 del 2016] Disponible en internet: http://www.scholarpedia.org/article/Voltage_clamp

ORIGIN [en línea] Origin and Origin pro disponible en:
<http://www.originlab.com/Origin>

ORTEGA, Jesús Eduardo., et al. Reproduction of an Introduced Population of *Eleutherodactylus johnstonei* at Bucaramanga, Colombia. En: Copeia. Agosto, 2003, vol, 3, 642–648 p

PIRATOBA MORALES, Ulises. VERA LOPEZ, Enrique. ORTIZ OTALORA, Cesar aspectos básicos en la interpretación de diagramas de impedancia electroquímica Publicado en: ISSN 0012-7353. Junio de 2010.

RADESCA, Daniel. Inclusión de una célula nerviosa en un circuito electrónico de estimulación y medida. Montevideo: Universidad de la república. Núcleo de ingeniería biomédica, 2009. 10 p

ROBLES MORA, Leonor A. CHAVEZ CIFUENTES, Jair F. Medición de impedancia eléctrica en tejido cervical uterino in-vitro. Trabajo de grado ingeniero electrónico. Bucaramanga, Universidad Industrial de Santander. Facultad de ingenierías físico-mecánicas. Escuela de ingenierías eléctrica, electrónica y telecomunicaciones. Junio de 2005. 200 p.

SALAZAR MUÑOZ, Y. Introducción a la medida de impedancia eléctrica de tejidos biológicos. Capítulo 2. Disponible en:
<https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/93499/02Ysm02de07.pdf>

SAM3X / SAM3A Series Atmel | SMART ARM-based MCU DATASHEET. [en línea] Atmel. Disponible en: http://www.atmel.com/ru/ru/Images/Atmel-11057-32-bit-Cortex-M3-Microcontroller-SAM3X-SAM3A_Datasheet.pdf

SANTILLAN TOVAR, Gilberto. y CAMPOS DELGADO, Daniel U, Procesamiento digital de señales. Practica con Arduino Due UASLP. Facultad de ciencia. Marzo 2014

Sinewave 100k generator, DAC + PDC + Timer. [en línea] Arduino. Disponible en: <http://forum.arduino.cc/index.php?topic=224672.0>

Software Arduino. [en línea] Arduino Disponible en: <http://www.arduino.cc/en/Main/Software> [Consultado octubre 4 del 2015]

Tejidos animales epitelios de revestimiento [en línea] Atlas de histología vegetal y animal [consultado 01 Diciembre del 2016]. Disponible en internet: https://mmegias.webs.uvigo.es/guiada_a_revestimiento.php

TÍSCAR Jorge García [en línea] Arduino + Matlab: adquisición de datos. Disponible en: <https://wechoosethemoon.es/2011/07/15/arduino-matlab-adquisicion-de-datos/>

TEXAS INSTRUMENTS [en línea] LM79XX Series 3-Terminal Negative Regulators. Disponible en: <http://www.ti.com/lit/ds/symlink/lm7905.pdf>

Tumor [en línea]. Medline [consultado octubre 20 2016] disponible en internet: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/001310.htm>

WALKER, Dawn Carol. Modelling the Electrical Properties of Cervical Epithelium. Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy. U.K. University of Sheffield. Department of Medical Physics and Clinical Engineering. October 2001. 266 p.

ANEXOS

Anexo A. Código correspondiente al generador de onda sinusoidal con frecuencia variable y ajuste de offset (frecuencia de trabajo 1 khz a 100 khz)#include

```
<DueTimer.h>
```

```
int i=0;
```

```
int contador=31;
```

```
int seno[ ] = {2048,3251,3995,3995,3251,2048,844,100,100,844,2048};
```

```
void setup() {
```

```
    pmc_enable_periph_clk (DACC_INTERFACE_ID) ; // start clocking DAC
```

```
    DACC->DACC_CR = DACC_CR_SWRST ; // reset DAC
```

```
    DACC->DACC_MR =
```

```
    DACC_MR_TRGEN_DIS | DACC_MR_TRGSEL (0) | // MODE FREE
```

```
    (0 << DACC_MR_USER_SEL_Pos) | // select channel 0
```

```
    DACC_MR_REFRESH (0x0F) |
```

```
    (24 << DACC_MR_STARTUP_Pos) ;
```

```
    DACC->DACC_IDR = 0xFFFFFFFF ; // no interrupts
```

```
    DACC->DACC_CHER = DACC_CHER_CH0 << 0 ; // enable chan0
```

```
    analogWriteResolution(12);
```

```
    Timer3.attachInterrupt(myHandler).setPeriod(10).start(); // 1 us
```

```
    Timer4.attachInterrupt(Handler).setPeriod(1500000).start(); // 1.2 S
```

```
}
```

```
void loop() {
```

```
}
```

```
void myHandler(){
```

```
    i++;
```

```
    if (i==10) i=0;
```



```
DACC->DACC_CDR = seno[i] ;  
  
}  
  
void Handler(){  
  
    Timer3.attachInterrupt(myHandler).setPeriod(contador).start();  
  
    contador = contador-2;  
    if (contador<=0) contador=31;
```

Anexo B. Sensores de tensión, de corriente y de corriente de sodio: en el siguiente apartado se mostrara tanto el código empleado en Arduino como el empleado en matlab para la adquisición de datos

Codigo Arduino

```
unsigned long values[2000];

void setup() {
  Serial.begin(250000);

  ADC->ADC_MR |= 0x80; //set free running mode on ADC
  ADC->ADC_CHER = 0x80; //enable ADC on pin A0
}

void loop() {
  unsigned int i;

  for(i=0;i<2000;i++){
    while((ADC->ADC_ISR & 0x80)==0); // wait for conversion
    values[i]=ADC->ADC_CDR[7]; //get values
  }

  Serial.println("Values: ");
  for(i=0;i<2000;i++) {
    Serial.println(values[i]);
  }

  delay(2000);
}
```

Código de Matlab

```
clear ;
close all;
clc;

%%Habilitacion del puerto serial_Tension
delete(instrfind({'PORT'},{'COM8'}));
puerto_serial=serial('COM8','BaudRate',250000,'Terminator','CR/LF');
warning('off','MATLAB:serial:fscanf:unsuccessfulRead');
```

```

fopen(puerto_serial);

%Habilitacion del puerto serial_Corriente
delete(instrfind({'PORT'},{'COM11'}));
puerto_serial_1=serial('COM11','BaudRate',250000,'Terminator','CR/LF');
warning('off','MATLAB:serial:fscanf:unsuccessfulRead');
fopen(puerto_serial_1);

%%Iniciar parametros_Tension
y=zeros(1,20000);
t=zeros(1,20000);
contador_muestras=1;

%Iniciar parametros_Corriente
y_1=zeros(1,20000);
t_1=zeros(1,20000);
contador_muestras_1=1;

%%Recontrccion de la señal analogia_Tension y transformada de Furier
%Señal analogica
while contador_muestras<=20000;
ylim([0 3.4]);
valor_entrada=fscanf(puerto_serial,'%d');
y(contador_muestras)=(valor_entrada(1))*3.3/4096;

if contador_muestras==1
    t(contador_muestras)=0;
else
    t(contador_muestras)=t(contador_muestras-1)+2.000e-06;
end
contador_muestras=contador_muestras+1;

end

%Recontrccion de la señal analogia_Corriente y transformada de Furier
% Señal analogica
while contador_muestras_1<=20000;
ylim([0 3.4]);
valor_entrada_1=fscanf(puerto_serial_1,'%d');
y_1(contador_muestras_1)=((valor_entrada_1(1))*3.3/4096)/(100+200);

if contador_muestras_1==1
    t_1(contador_muestras_1)=0;
else

```

```

    t_1(contador_muestras_1)=t_1(contador_muestras_1-1)+2.000e-06;
end
contador_muestras_1=contador_muestras_1+1;
end

%%Limpieza del puerto_Tension
fclose(puerto_serial);
delete(puerto_serial);

%Limpieza del puerto_Corriente
fclose(puerto_serial_1);
delete(puerto_serial_1);

%%Configuracion del grafica_Tension
%Señal Anlogica
cc=1:1:contador_muestras;
figure
subplot(1,2,1);
plot(t,y,'X-r');
title('Señal Analogica Tension');
xlabel('Tiempo (s)');
ylabel('Tension(V)');

%Configuracion del grafica_Corriente
% Señal Anlogica
cc_1=1:1:contador_muestras_1;
subplot(1,2,2);
plot(t_1,y_1,'X-r');
title('Señal Analogica Corriente');
xlabel('Tiempo (s)');
ylabel('Corriente(A)');

```